

**Universidad Autónoma de Madrid
Departamento de Bioquímica**

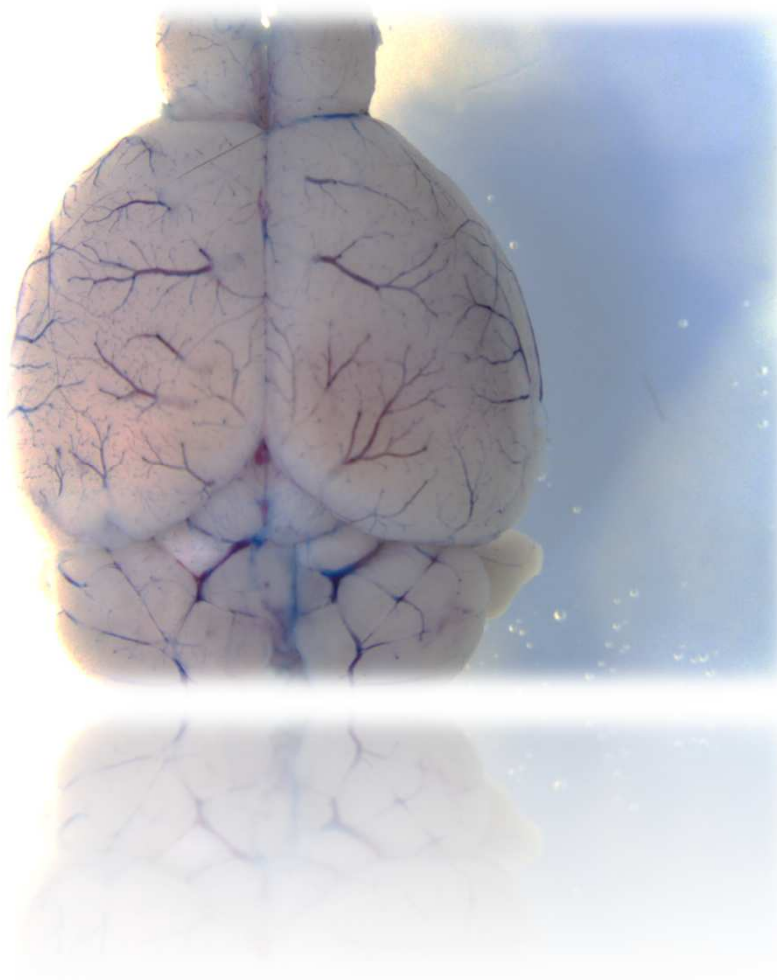


**Función de Sfrp1 (*Secreted Frizzled Related Protein 1*)
durante el desarrollo de la corteza cerebral y estudio de
su posible implicación en la Enfermedad de Alzheimer**

Tesis doctoral

Inmaculada Crespo Galán

Madrid, 2015



Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid



Función de Sfrp1 (*Secreted Frizzled Related Protein 1*) durante el desarrollo de la corteza cerebral y estudio de su posible implicación en la Enfermedad de Alzheimer

Inmaculada Crespo Galán
Licenciada en Psicología

Directoras de Tesis doctoral:
Paola Bovolenta Nicolao
Pilar Esteve Pastor

Madrid 2015

Pilar Esteve Pastor, Doctor en Biología, Científico Titular del CSIC en el CBMSO

Paola Bovolenta, Doctor en Biología, Profesor de Investigación del CSIC en el CBMSO

CERTIFICAN: Que Doña Inmaculada Crespo Galán ha realizado bajo su dirección el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título: “Función de Sfrp1 (Secreted Frizzled Related Protein 1) durante el desarrollo de la corteza cerebral y estudio de su posible implicación en la Enfermedad de Alzheimer”. Los datos que se presentan en esta Tesis son originales y resultado de trabajo realizado en el Instituto Cajal, CSIC, durante los años 2010-2011 y en el CBMSO, CSIC-UAM entre los años 2012-2015. El trabajo tiene la debida calidad para su defensa y calificación en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, para la obtención del Título de Doctor en Biología.

Dras Pilar Esteve Pastor y Paola Bovolenta

Madrid. Noviembre 2015.

AGRADECIMIENTOS

Hace algún tiempo leí una frase que, aunque inicialmente me pareció confusa, me impactó y creo que este es un buen momento para reproducirla: *“Aprender cómo pensar significa realmente cómo ejercer control sobre cómo y qué piensas; lo que significa ser lo bastante consciente para elegir a qué prestas atención y cómo construir significado desde la experiencia”* (Foster Wallace, 2005). Pues bien, afortunadamente he podido ejercer esa libertad a lo largo de estos años prestando atención a distintos contenidos desde diferentes niveles de estudio. En esta experiencia no he estado sola y han intervenido muchas personas quienes con su forma de ver los problemas, sus conocimientos y su buen hacer me han abierto un abanico de posibilidades. Así que es el momento de dar las gracias más sinceras a todas y cada una de ellas, esperando no olvidar a nadie (y si lo hago perdonadme). Para ello comenzaré por las directoras de este trabajo.

Muchas gracias a las dos por todo lo que me habéis enseñado, no os imagináis la influencia que habéis tenido sobre mí en estos años, no sólo en mi formación sino también en la visión de la Ciencia y del mundo que lo rodea. Sois muy diferentes pero afortunadamente complementarias y eso se traduce en una formación mucho más enriquecedora, así que me siento privilegiada por haberos tenido como directoras de tesis y por haberme adentrado en este campo tan interesante. Un día confiasteis en mí, a pesar de la lejanía desde la cual procedía, y me disteis una oportunidad que he intentado aprovechar. Siempre habéis estado a mi lado y resuelto de forma muy eficiente las dificultades con las que me he encontrado a lo largo de este tiempo.

Pilar, desde que me enseñaste a hacer mi primera *miniprep* (cuánto tiempo ya) no he parado de aprender día a día. Ahora mirando hacia atrás me he dado cuenta del peso tan importante que has tenido sobre mi formación. Has sido paciente conmigo y me has ido orientando paso a paso. Además, tu forma de plantearte las dificultades me ha ayudado a ver que otras opciones también son posibles. He aprendido mucho de ti y por eso tengo que darte las gracias.

Paola, sinceramente creo que eres una de las personas más trabajadoras y eficientes que he conocido. Envidio, sanamente, tu capacidad de concentración, conocimientos, y la forma de conceptualizar los problemas. Siempre has tenido una sonrisa y buenas palabras cada vez que te he interrumpido, cosa que valoro tremendamente, y soluciones prácticas a todos los problemas científicos y no científicos que te he planteado en este tiempo.

Y ahora mis compañeros, muchas gracias a todos vosotros, especialmente a Lara por esos momentos de charla e introspección, la de chocolate que hemos comido y nos queda aún por comer; a Afri por su fuerza ante la vida, espero que se cumpla tu sueño; a Luisa, aprendí mucho de ti y disfruté siendo tu compañera de escritorio, mucho ánimo; a Javi por sus risas y su forma de ver la vida, a Chus por su gran ayuda en las fases finales de la tesis, a Curro por tus electroporaciones y enseñarme esta técnica, no veas cómo electroporo ahora; y a todos los demás Ale, Beatriz, Chus, Cristina, Elsa, Flor, Isidro, Juan, Marcos, María, Miriam, Noe, Raquel y Thomas, de todos vosotros me llevo cosas muy buenas.

También quiero dar las gracias a los buenos profesores que tuve en Psicología y Nutrición, por haberme ayudado con cosas que de lo contrario me habrían resultado difíciles, ayudarme a perder mi miedo hacia la Biología y por supuesto transmitirme su

entusiasmo por este trabajo. Probablemente de no haber sido por ellos no habría comenzado en investigación o lo habría abandonado. Luis, muchas gracias por explicarme tan bien el metabolismo y por confiar en mí, espero que sigas siendo tan buen profesor como lo fuiste conmigo.

Quiero dar las gracias además a Carlos Vicario y toda la gente de su laboratorio, Carlos Omar, Çagla, Inma, Eva D., Eva R., María José, y Vanesa, me he sentido muy bien con todos vosotros este año, he aprendido muchísimo y habéis conseguido hacerme más llevadera la etapa quizás más árida de la tesis.

Y no puedo terminar sin dar las gracias a las Instituciones como el Instituto Cajal, el CBMSO, la UAM y el C.U. Cardenal Cisneros. Y por supuesto, a los alumnos que he conocido a lo largo de estos años. Ellos afortunadamente me contagian tanto sus curiosidades como su ilusión, algo imprescindible en este trabajo, y me empujan a seguir formándome. Para finalizar dejo a los más cercanos, mis grandes pilares: mi familia, que ha ido aumentando en estos años dándome muchas alegrías y mis amigos “de toda la vida”, quienes siempre han estado ahí haciéndome reír incluso en los momentos más duros.

GRACIAS A TODOS

RESUMEN

Las proteínas Secreted Frizzled Related Proteins (Sfrps) son una familia de moléculas solubles relacionadas estructuralmente con la parte extracelular de los receptores Frizzled. Además de su papel como antagonistas de los ligandos Wnt, estas proteínas tienen otras funciones. Trabajos previos del laboratorio han demostrado que, en retina periférica, las Sfrps son requeridas para la activación de la vía de señalización Wnt/ β -catenina al favorecer la difusión de los ligandos Wnt. En la retina neural central en cambio, las Sfrps modulan la actividad metaloproteínasa ADAM10, una α -secretasa responsable del procesamiento de múltiple substratos, incluidos los receptores Notch y la proteína precursora de amiloide (APP). A través de la regulación de Notch, las Sfrps por lo tanto contribuyen a una correcta neurogénesis en la retina.

En esta tesis hemos analizado si esta doble función de las Sfrps ocurre únicamente en la retina o se produce también en otras regiones del Sistema Nervioso Central del ratón. Por ello, nos hemos centrado en el telencéfalo donde *Sfrp1* se expresa abundantemente durante la etapa embrionaria. Nuestros datos indican que la inactivación genética de *Sfrp1* implica un descenso en la señalización de la vía Wnt/ β -catenina en el palio medial embrionario con una consecuente reducción del primordio hipocampal y una expansión de la futura neocorteza, defectos que se mantienen en estadios postnatales. Por otro lado, en el palio dorsal, los embriones *Sfrp1*^{-/-} presentan de forma transitoria una mayor activación de la vía de señalización de Notch y una leve disminución de la expresión de Axina2, una diana de la vía β -catenina. Estos cambios moleculares se asocian a un incremento en la proliferación de los progenitores, con el resultado que el neocórtex postnatal de los ratones *Sfrp1*^{-/-} es más grueso.

Sfrp1 se expresa en la corteza cerebral también en la etapa adulta, y su expresión aumenta en situaciones patológicas como la Enfermedad de Alzheimer (EA). En esta tesis nos hemos preguntado si *Sfrp1*, regulando ADAM10, influye en el procesamiento de APP y por lo tanto en la formación de placas amiloideas. Puesto que ADAM10 corta APP dentro de la secuencia A β , generando un fragmento sAPP α y previniendo la formación de péptidos A β , una mayor actividad de ADAM10 debería aumentar los niveles de sAPP α y disminuir los de A β . Nuestro análisis demuestra que en ratones silvestres la inactivación genética de *Sfrp1* incrementa los niveles de sAPP α . Además, en un modelo murino de EA junto a la deficiencia de *Sfrp1*, se observa un descenso en el número de placas amiloideas y de los daños cognitivos que normalmente caracterizan estos ratones.

En su conjunto, los datos obtenidos en este trabajo revelan que *Sfrp1* desempeña un papel importante en la corteza cerebral durante el desarrollo embrionario y en la homeostasis del cerebro adulto. Además, abre una importante puerta en la comprensión de las bases moleculares de enfermedades del desarrollo como el autismo así como en el diagnóstico y posible tratamiento de la EA.

PALABRAS CLAVE:

ADAM10; APP; desarrollo cortical; enfermedad de Alzheimer; hipocampo; neocórtex; Notch; ratón; *Sfrp1*; Wnt/ β -catenina

ABSTRACT

Secreted Frizzled Related Proteins (SFRPs) are a family of soluble molecules structurally related to the extracellular part of the Frizzled receptor. Besides acting as Wnt ligand antagonists, these proteins have several additional Wnt-related and unrelated functions. Previous work from the laboratory has shown that in the retinal periphery Sfrp proteins are required for Wnt/ β catenin signaling activation by favoring Wnt ligand diffusion. In central neural retina, Sfrps modulate Adam10 metalloproteinase activity, which is the α -secretase responsible for Notch receptor and amyloid precursor protein (APP) cleavage. Through regulation of Notch, the SFRPs contribute to a correct retinal neurogenesis.

In this thesis we have analyzed whether this double function is unique to the retina or operates in other regions of the mouse central nervous system. We have focused on the forebrain where Sfrp1 is strongly expressed during the embryonic stages. Our data indicate in the developing telencephalon genetic inactivation of Sfrp1 cause a reduction in canonical Wnt signaling. As a consequence the hippocampal primordium is reduced and the future neocortex expanded defects that persist in postnatal stages. Furthermore, at early stages of corticogenesis of the dorsal *pallium*, the null Sfrp1 embryos present a transiently enhanced activity of Notch signaling and a small decrease in *Axin 2* expression, a direct target of β -catenin pathway. These molecular changes lead to an increased proliferation and to a thicker postnatal neocortex.

Sfrp1 is expressed at low levels in the cerebral cortex also in adulthood, but its expression increases in pathological conditions such as Alzheimer's Disease (AD). In this thesis we have asked whether in the brain, Sfrp1 regulates ADAM10 proteolytic activity, modulating APP cleavage and consequently affecting the amyloid plaques formation. ADAM10 cleaves APP within the A β sequence, generating a fragment sAPP α impeding the formation of A β peptides. Thus, increased ADAM10 activity should result in an increase and decrease sAPP α and A β fragments, respectively. Our analyses show that genetic inactivation of Sfrp1 in wild type mice increases the cortex levels of sAPP α . Furthermore, Sfrp1 deficiency in a murine model of AD, cause a reduction in the number of amyloid plaques and in the cognitive impairments which characterize these mice.

Taken together, the data obtained from this study show that Sfrp1 play an important role in cerebral cortex during embryonic development and in the homeostasis adult brain. It also opens an important alternative in understanding the molecular basis of developmental disorders such as autism and the diagnosis and possible treatment of AD.

KEYWORDS:

ADAM10; Alzheimer's disease; APP; cortical development; hippocampus; mouse; neocortex; Notch; Sfrp1; Wnt/ β -catenin

ÍNDICE

CLAVE DE ABREVIATURAS	7
1. INTRODUCCIÓN	10
1.1. Descripción de <i>Secreted Frizzled Related Protein 1</i> (Sfrp1):	11
1.1.1. Estructura y patrón de expresión de Sfrp1 en el cerebro	11
1.1.2. Mecanismo de acción de Sfrp1	12
1.1.2.1. Sfrp1 como modulador de la vía Wnt/ β -catenina	12
1.1.2.2. Sfrp1 como modulador negativo de la actividad proteolítica de ADAM10	15
1.2. Desarrollo de la corteza cerebral	17
1.2.1. Regionalización telencefálica	17
1.2.2. Proliferación de precursores neurales y neurogénesis	20
1.2.2.1. Identidad y la proliferación de las células de glía radial (CGR) y las células progenitoras intermedias (CPI): β -catenina	21
1.2.2.2. Identidad y la proliferación de las CGR y las CPI: la vía de Notch	23
1.3. Enfermedad de Alzheimer (EA)	25
1.3.1. Principales características de la EA	25
1.3.2. La proteína precursora de amiloide (APP) y su procesamiento	27
2. OBJETIVOS	31
3. MATERIALES Y MÉTODOS	33
3.1. Animales	34
3.2. Inmunohistoquímica e hibridación <i>in situ</i>	35
3.3. Detección de placas beta-amiloide	37
3.4. Western blot	37
3.5. Electroporación <i>in útero</i> y detección de Top RFP	38
3.6. Estudios comportamentales	38
3.7. Análisis estadísticos	40
4. RESULTADOS	41
4.1. La presencia de Sfrp1 es necesaria para el desarrollo correcto de la corteza cerebral	42
4.1.1. Sfrp1 se expresa abundantemente en el neuroepitelio cortical durante el desarrollo embrionario.	42
4.1.2. Sfrp1 contribuye al correcto desarrollo hipocampal regulando positivamente la activación de la vía Wnt/ β -catenina	43
4.1.3. La deficiencia de Sfrp1 provoca alteraciones en la neurogénesis embrionaria cortical a través de la vía Notch y Wnt/ β -catenina	48
4.1.4. Los defectos producidos durante el desarrollo embrionario por la deficiencia de Sfrp1 causa alteraciones histológicas postnatales	53
4.2. Sfrp1 interfiere con la proteólisis de APP, un sustrato de ADAM10	56
4.2.1. La proteína Sfrp1 se localiza junto a APP y ADAM10 en las paredes del ventrículo lateral e interfiere en el procesamiento de APP.	56
4.2.2. Sfrp1 aumenta la producción del péptido A β y favorece su agregación en forma de placas	59
4.2.3. La inactivación genética de Sfrp1 previene la aparición de déficits comportamentales en los ratones APP/PS1	62
5. DISCUSIÓN	65
5.1. Sfrp1 y el desarrollo de la corteza cerebral	66
5.1.1 Sfrp1 es necesario para el establecimiento de la proporción entre territorio neocortical y el territorio hipocampal	66
5.1.2. Sfrp1 modula la proliferación de los precursores neurales y la neurogénesis	68
5.2. Sfrp1 regula el procesamiento de APP	71
6. CONCLUSIONES	77
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
8. ANEXO	90

CLAVE DE ABREVIATURAS

ADAM	<i>A disintegrin and metalloprotease</i>
AICD	Dominio intracelular de APP
APC	Coli poliposis adenomatosa
APOE4	Apolipoproteína E4
APP	Proteína precursora de amiloide
Aβ	Péptido β amiloide
BACE1	Enzima 1 que corta en el sitio β de APP
BMP	Proteína morfogénica del hueso
CA	<i>Cornu ammonis</i>
CGR	Células de glía radial
CK1	Caseína quinasa 1
CPI	Célula progenitora intermedia
CRD	Dominio rico en cisteínas
Dkk	<i>Dickkopf-related protein 1</i>
Dll1	<i>Delta-like 1</i>
Dsh	<i>Dishevelled</i>
EA	Enfermedad de Alzheimer
FrzA	<i>Frizzled in aorta</i>
FT	Factor de transcripción
Fz	<i>Frizzled</i>
GSK3	Glucógeno sintasa quinasa 3
HSPG	Proteoglicano heparán-sulfato
ICV	Intracerebroventricular
IDE	Enzima de degradación de la insulina
LCR	Líquido céfalo-raquídeo
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LRP	Proteína relacionada con LDL
LTP	Potenciación a largo plazo
NICD	Dominio de Notch intracelular
NTR	Dominio relacionado con netrina
PCP	Polaridad planar celular
PET	Tomografía por emisión de positrones
PIB	<i>Pittsburgh compound B</i>
PS1	Presenilina 1
PS2	Presenilina 2
sAPPα	Fragmento soluble α -APP (sAPP α)
sAPPβ	Fragmento soluble β -APP (sAPP β)
SARP2	<i>Secreted Apoptosis Related Protein</i>
Sfrp1	<i>Secreted Frizzled Related Protein 1</i>
Shh	<i>Sonic Hedgehog</i>
SN	Sistema nervioso
TCF/LEF	Factor de células T/Factor potenciador linfoide
TIMP	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
ZSV	Zona subventricular
ZV	Zona ventricular
α-CTF	Fragmento α terminal carboxílico
β-CTF	Fragmento β terminal carboxílico

*“Debemos dejar siempre lugar a la duda o no
habrá progreso ni aprendizaje”
(Feynman, 1964)*

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

La corteza cerebral es una de las estructuras más complejas del Sistema Nervioso (SN) que se encarga de controlar las funciones cognitivas superiores. En los humanos, entre un 70-80% de las neuronas del SN se localizan en esta estructura siendo de gran importancia el desarrollo y homeostasis del tejido cortical, el cual está bajo el control de múltiples procesos coordinados en el espacio y tiempo.

En cuanto a su origen embrionario, la corteza cerebral deriva de la parte más anterior de la placa neural del ectodermo que, cuando adquiere las características neurales, se regionaliza molecularmente subdividiéndose en diferentes territorios y transformándose en el tubo neural. La parte más anterior del tubo neural sufre grandes cambios anatómicos dando lugar a tres vesículas, entre las que se encuentra el prosencéfalo primario. Con el paso del tiempo, éste vuelve a vesicularizarse y se transforma, entre otras estructuras, en las vesículas telencefálicas, que están sometidas a un gran crecimiento hasta que se convierten en la corteza cerebral y el subcórtex.

El establecimiento del campo morfogenético del telencéfalo está controlado por varias moléculas de señalización y factores de transcripción. Estas proteínas posibilitan la regionalización en el eje dorso-ventral y antero-posterior y por tanto el desarrollo correcto de la corteza cerebral. La familia de proteínas Wnt forma parte de este entramado molecular favoreciendo tanto la dorsalización como la posteriorización de esta estructura. Sus funciones están finamente reguladas por múltiples proteínas entre las que se encuentran la proteína *Sfrp1* (del inglés *Secreted Frizzled Related Protein 1*), aunque como veremos más adelante *Sfrp1* además tiene funciones independientes de Wnt. Estudios en pez medaka y pollo muestran que *Sfrp1* se expresa en estadios muy tempranos en la placa neural anterior al final de la gastrulación y en el telencéfalo al final de la neurulación y estadios posteriores (Esteve et al., 2004; Esteve et al., 2000). Tanto la sobre-expresión como la interferencia de *Sfrp1* en pez medaka produce cambios en el dominio telencefálico (Esteve et al., 2004; Lopez-Rios et al., 2008). Sin embargo, su papel en mamíferos aún no se ha analizado lo que hace necesario explorar su función.

Postnatalmente, la corteza cerebral continua cambiando y sufre continuas reorganizaciones en la conectividad neural que posibilitan, en último término, el desempeño de las funciones cognitivas. Fenómenos que interfieren en este proceso van a dar como consecuencia la aparición de graves enfermedades neuropsicológicas como la enfermedad de Alzheimer (EA). *Sfrp1* también se expresa durante la etapa postnatal en la corteza cerebral en ratón (Shimogori et al., 2004) y su nivel se incrementa en el hipocampo de pacientes con EA (Blalock et al., 2004). Sin embargo, tampoco se ha explorado su función en esas situaciones. Lo que nos lleva a preguntarnos si *Sfrp1* está implicada en aspectos relacionados con la EA.

Para responder a estas preguntas, previamente describiremos las principales características de Sfrp1 y los aspectos más relevantes en la formación del telencéfalo y la EA.

1.1. Descripción de *Secreted Frizzled related protein 1* (Sfrp1):

1.1.1. Estructura y patrón de expresión de Sfrp1 en el cerebro

Sfrp1 también conocida como *Secreted Apoptosis Related Protein* (SARP2) o *Frizzled in aorta* (FrzA), es miembro de una familia de proteínas secretables implicadas en el desarrollo embrionario y en la homeostasis celular del cerebro adulto (Bovolenta et al., 2008). Las Sfrps son proteínas de unos 36 kDa que se identificaron de forma independiente por varios grupos como moléculas solubles implicadas en la modulación de la apoptosis y como antagonistas de Wnt durante el desarrollo embrionario (Leyns et al., 1997; Melkonyan et al., 1997; Wang et al., 1997). En mamíferos esta familia está formada por cinco miembros, y se subdivide en dos subgrupos formados por Sfrp1, 2, y 5 por un lado y Sfrp3, 4 por el otro, con un posible origen evolutivo diferente (Leclerc and Rentzsch, 2012; Rattner et al., 1997).

El gen *Sfrp1* está formado por tres exones que codifican una proteína de alrededor de 314 aminoácidos (Finch et al., 1997; Garcia-Hoyos et al., 2004) donde más del 90% de los aminoácidos están conservados entre rata, ratón y humano (Katoh and Katoh, 2005). Sfrp1, al igual que Sfrp2 y 5, está formada por dos motivos, codificados por el primer y tercer exón respectivamente, que se pliegan de forma independiente (Chong et al., 2002). El extremo N-terminal contiene un péptido señal que permite su secreción, seguido por un dominio rico en cisteínas (CRD), concretamente 10 cisteínas que forman 5 puentes disulfuro cuyo patrón está conservado entre los distintos Sfrps (Banyai and Patthy, 1999; Chong et al., 2002). Este dominio es homólogo a la parte extracelular de los receptores Frizzled (Fz) responsable de la unión de ligandos Wnt, razón por la que se los identificó como antagonistas de Wnt. El dominio C-terminal se caracteriza por presentar un segmento rico en residuos hidrofóbicos y 6 cisteínas que forman un patrón de 3 puentes disulfuro. Este dominio está presente en proteínas con funciones muy distintas, como netrina (NTR), una proteína implicada en guía axonal, los inhibidores de metaloproteinasas TIMPs (del inglés *tissue inhibitors of metalloproteinases*), las enzimas que procesan y producen una proteína fibrilar madura *Procollagen C-endopeptidases enhancer* (PCOLCEs) y las proteínas del complemento C3, C4 y C5 cuya función principal es la respuesta inmunitaria defensiva ante un patógeno (Banyai and Patthy, 1999; Chong et al., 2002; Esteve and Bovolenta, 2010).

La expresión de *Sfrp1* en mamíferos es alta en el cerebro, riñón, ojo, bazo, abdomen, corazón y somitas (Trevant et al., 2008). Hasta el momento sólo se han descrito defectos fenotípicos en los ratones deficientes para Sfrp1 en la formación del hueso (Gaur et al., 2006), en el sistema hematopoyético (Renstrom et al., 2009) y en el riñón (Trevant et al., 2008), lo que indica que Sfrp1 tiene un posible papel no redundante con respecto a otros Sfrps en la

función de estos órganos. Sin embargo, aún no se ha estudiado la función de *Sfrp1* en cerebro, donde este gen se expresa abundantemente en estadios tempranos del desarrollo. En ratón, su expresión es muy alta en el telencéfalo dorsal, menos evidente en el telencéfalo ventral y no se detecta en el parte medial (Kim et al., 2001). Un estudio reciente describe que *Sfrp1* también se expresa en el telencéfalo temprano en humanos, en concreto en las células de glía radial (CGR) en la semana gestacional 14.5 (equivalente en ratón al día embrionario (E) 13.5) (Lui et al., 2014). En estadios postnatales (P) entre 7 y 20 días (P7-P20) *Sfrp1* se expresa principalmente en el giro dentado del hipocampo, las paredes del ventrículo lateral, la ruta migratoria rostral y la corteza cingulada del ratón (Shimogori et al., 2004). En la etapa adulta su expresión disminuye localizándose en células del neocórtex, plexo coroideo y ventrículo lateral (<http://www.gensat.org>). Este descenso de la expresión con el paso del tiempo también se detecta en ensayos de *northern blot* (Augustine et al., 2001). Por el contrario, ante situaciones neuropatológicas como la EA los niveles de ARNm de *Sfrp1* en humanos se incrementan progresivamente según avanza la enfermedad, como se muestra mediante ensayos de *microarray* a partir de muestras de hipocampo (Blalock et al., 2004). Por tanto, queda patente que la expresión del ARNm de *Sfrp1* en cerebro va disminuyendo desde las etapas embrionarias hasta la edad adulta (<http://developingmouse.brain-map.org/gene/show/20140>) y se incrementa en situaciones neuropatológicas.

1.1.2. Mecanismo de acción de Sfrp1

Desde la identificación de *Sfrp1* se ha descrito que esta proteína, además de presentar funciones dependientes de Wnt (Uren et al., 2000), tiene capacidad para unirse a los receptores Fz (Lopez-Rios et al., 2008; Rodriguez et al., 2005), interactuar e inhibir la actividad de RANKL (Hausler et al., 2004) una proteína asociada a la formación de osteoclastos, unirse a trombospondina 1 previniendo la adhesión celular (Martin-Manso et al., 2011) y modular negativamente la actividad de ADAM10 (Esteve et al., 2011a), lo que amplía considerablemente el espectro de sus actividades. A continuación nos centraremos en la modulación que ejerce *Sfrp1* sobre la vía Wnt/ β -catenina y ADAM10 en el SN.

1.1.2.1. Sfrp1 como modulador de la vía Wnt/ β -catenina

Las proteínas Wnt son una familia de 19 miembros en mamíferos que juegan funciones en el desarrollo embrionario y en la homeostasis de tejidos adultos. Las Wnt son ligandos que se unen a los receptores Fz activando una vía de señalización compleja con tres ramas, una canónica conocida como Wnt/ β -catenina que regula la transcripción de genes y dos no canónicas, la rama de la polaridad planar celular (PCP) relacionada con el citoesqueleto y la rama Wnt/calcio implicada en la entrada de Ca^{2+} a la célula (Harrison-Uy and Pleasure, 2012).

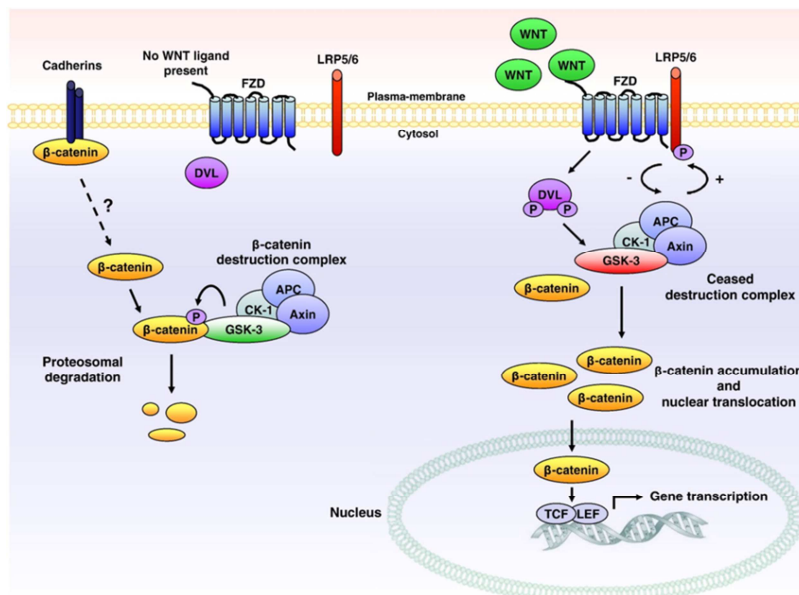


Fig. 1. Mecanismo de acción de la vía canónica Wnt/β-catenina. En ausencia del ligando Wnt, β-catenina es fosforilada y degradada vía proteosoma. Sin embargo, cuando el ligando Wnt se une al receptor Fz se destruye el complejo de fosforilación por lo que β-catenina se acumula en el citoplasma y transloca al núcleo donde activa la transcripción de genes diana de la vía (esquema de Baarsma et al., 2013).

Cuando no hay ligandos Wnt en el espacio extracelular, la vía Wnt/β-catenina está silenciada (Fig.1) ya que en el citoplasma β-catenina es fosforilada, ubiquitinada y degradada por la vía proteosoma a través del complejo formado por la proteína adaptadora Axina (dos parálogos relacionados, axina1 y axina2), la coli poliposis adenomatosa (APC), la caseína quinasa 1 (CK1) y la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3). Las quinasas CK1 y GSK3β fosforilan de forma secuencial β-catenina en la región N-terminal, quedando así marcada para su degradación. La unión de ligandos Wnt (Fig.1) al complejo formado por el receptor Fz y el co-receptor de la proteína relacionada con el receptor de la lipoproteína de baja densidad (LRP), promueve el reclutamiento de la proteína Dishevelled (DVL) a la membrana plasmática y su activación mediante fosforilación. La forma activa de DVL a su vez recluta la proteína axina (Fig.1). De esta forma, β-catenina no es fosforilada y no es susceptible de ser degradada por lo que se acumula en el citosol y se transloca al núcleo. En el núcleo los factores de transcripción (FT) TCF/Lef1 (desde el inglés *T-Cell factor/Lymphoid-enhancer factor*) forman un complejo con el co-represor Groucho, que favorece la compactación de la cromatina impidiendo la transcripción de genes diana; β-catenina desplaza Groucho del complejo y recluta co-activadores favoreciendo la transcripción de diversos genes diana importantes en el desarrollo embrionario, así como en el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos en etapa adulta (Holly et al., 2014; MacDonald et al., 2009).

Los receptores Fz en humanos son una familia de 10 proteínas, formadas por siete dominios transmembrana asociados a proteínas G, que además poseen un dominio extracelular CRD en el extremo amino terminal a través del cual interaccionan con las proteínas Wnt (Dann et al., 2001). El dominio CRD de Sfrp1 comparte un 30-50% de identidad aminoacídica con la porción extracelular de Fz, y un patrón conservado de 10 cisteínas y 5 puentes disulfuro (Chong et al., 2002). Estos dominios CRD tienen capacidad de unirse entre sí

(Dann et al., 2001), de esta forma Sfrp1 puede interactuar tanto con los Fz (Lopez-Rios et al., 2008) como con las Wnt (Bafico et al., 1999).

Los primeros estudios en desarrollo de *Xenopus* y células de *Drosophila* demuestran que las Sfrps, a través del dominio CRD, secuestran las moléculas Wnt/Wingless (Wg) (homólogos de Wnt en *Drosophila*) o bloquean los receptores Fz, teniendo así un papel antagonista en la vía de Wnt/ β -catenina (Bafico et al., 1999; Rattner et al., 1997). Estudios posteriores describen que el CRD no es requerido para la unión entre Sfrp y Wg (Uren et al., 2000). En esta misma línea, un trabajo de nuestro laboratorio realizado en embriones de pez medaka y en líneas celulares demuestra que, en ensayos de sobreexpresión, el dominio NTR de Sfrp1 se une a Wnt mientras que el dominio CRD lo hace a los receptores Fz, antagonizando en ambos casos la actividad transcripcional de la vía Wnt/ β -catenina (Lopez-Rios et al., 2008). Además, un trabajo reciente, demuestra que a pesar de que el dominio CRD de Sfrp1 no se une a Wnt3a, este dominio favorece la actividad de β -catenina mediada por Wnt3a, por mecanismos alternativos a la unión a éste y relacionados con los receptores Fz (Xavier et al., 2014). Por tanto, parece que la modulación de Sfrp1 en la vía de β -catenina es compleja tanto por su unión a los ligandos Wnt como a los receptores Fz.

Aunque los ensayos de sobre-expresión de Sfrp1 indican que esta proteína tiene un papel como antagonista de la vía de Wnt, ensayos de falta de función sugieren en muchos casos mecanismos de acción alternativos. Así Sfrp1, Sfrp3 y Crescent (un miembro de la familia Sfrp no presente en mamíferos) actúan como moduladores positivos de la vía (Esteve et al., 2011b; Mii and Taira, 2009). Las proteínas Wnt difunden poco ya que sufren una modificación lipídica que favorece su asociación a la membrana plasmática. Su dispersión está además limitada por su interacción con proteoglicanos de tipo heparán sulfato (HSPGs) (Tsuda et al., 1999; Willert et al., 2003). Sin embargo, existen mecanismos que permiten su difusión (MacDonald et al., 2009) como son la formación de multímeros de moléculas Wnt, la unión de Wnt a lipoproteínas, o su unión a proteínas como las Sfrps. Se ha demostrado en la gastrulación de embriones *Xenopus* y en el desarrollo de la periferia de la retina neural del ratón que bajas concentraciones de Sfrps transportan las moléculas Wnt aumentando su grado de difusión y por lo tanto ampliando el rango de señalización Wnt/ β -catenina (Esteve et al., 2011b; Holly et al., 2014; Mii and Taira, 2009). El papel de Sfrp1 como modulador positivo de la vía Wnt/ β -catenina también tiene lugar durante el desarrollo de la lente, donde se ha demostrado que ratones deficientes en *Sfrp1* y *Sfrp2* presentan una disminución en la actividad transcripcional de TCF/Lef (Sugiyama et al., 2013).

Además, ensayos *in vitro* demuestran que Sfrp1 actúa como una molécula bifásica dependiendo del contexto celular y de su concentración. Así, en células HEK293-T y S2 de *Drosophila* concentraciones bajas de Sfrp1 aumentan la actividad transcripcional mediada por

β -catenina (armadillo en *Drosophila*), mientras que concentraciones altas inhiben dicha actividad; sin embargo, en fibroblastos L929 (células L) este efecto no se produce (Mangale et al., 2008; Uren et al., 2000; Xavier et al., 2014). En este mismo sentido, en cultivos primarios de progenitores del mesencéfalo ventral también se observa un efecto dosis-dependiente. Así, concentraciones altas de Sfrp1 desencadenan un efecto negativo sobre la supervivencia celular mientras que concentraciones medias-bajas favorecen la diferenciación de neuronas dopaminérgicas (Kele et al., 2012). Detrás del patrón bifásico de regulación puede estar al menos dos mecanismos aún por comprobar (Uren et al., 2000): Sfrp1 podría tener dos sitios de unión para Wnt con diferentes afinidades o alternatively Sfrp1 podría unirse a Wnt en bajas concentraciones y a Fz en altas concentraciones. En este sentido, se ha descrito que Sfrp1 se une al receptor Fz2 en ensayos con células HEK 293-T co-transfectadas con Sfrp1-myc y Fz2-hemaglutinina (HA) (Rodriguez et al., 2005) y a los receptores Fz5 a partir de ensayos con células HEK 293-T co-transfectadas con Sfrp1-NTR-myc y Fz5-HA (Lopez-Rios et al., 2008).

A pesar de que los estudios de sobre-expresión y falta de función indican distintos modos de actuación sobre la vía de Wnt, la función fisiológica de Sfrp1 parece depender del contexto celular y su función puede estar ligada también a otras vías de señalización y mecanismos de actuación.

1.1.2.2. Sfrp1 como modulador negativo de la actividad proteolítica de ADAM10

Uno de estos mecanismos adicionales de las Sfrps es la regulación de la actividad proteolítica de ADAM10, una proteína que pertenece a la familia de las desintegrinas y metaloproteinasas (ADAMs) (Rivera et al., 2010). ADAM10 es la α -secretasa constitutiva por excelencia en neuronas primarias (Jorissen et al., 2010; Kuhn et al., 2010), está anclada a membrana y tiene una actividad *sheddas*, es decir, tiene actividad proteolítica sobre proteínas de membrana liberando el ectodominio de dichas proteínas al espacio extracelular (Reiss and Saftig, 2009). Además, este primer corte permite un segundo procesamiento de algunas proteínas por el complejo γ -secretasa, liberando fragmentos intracelulares que se translocan al núcleo donde ejercen funciones de regulación de la actividad transcripcional. ADAM10 está compuesta de 770 aminoácidos en humanos, con una estructura conservada formada por varios dominios (Seals and Courtneidge, 2003) y se expresa de forma ubicua en el embrión y el adulto (<http://developingmouse.brain-map.org/gene/show/11275>).

Los sustratos de ADAM10 incluyen proteínas de adhesión, factores de crecimiento, o citoquinas, entre otros, regulando así distintos procesos biológicos (Pruessmeyer and Ludwig, 2009). Otros sustratos son el receptor Notch y la proteína precursora de amiloide (APP). Notch es un receptor de membrana que cuando se une al ligando canónico Delta-like o Jagged activa una cascada de señalización y ejerce funciones fundamentales en el desarrollo de la mayoría de los tejidos, incluido el SN (Kopan and Ilagan, 2009). APP es una proteína transmembrana

que regula el crecimiento de neuritas, la sinaptogénesis, el tráfico axonal, la adhesión celular o el metabolismo del Ca^{2+} , entre otras funciones (Zhang et al., 2011).

ADAM10 es necesaria para un desarrollo embrionario correcto. Así, los ratones deficientes en *ADAM10* mueren en E9.5 mostrando múltiples defectos en la formación de los somitos y en el sistema cardiovascular (Hartmann et al., 2002). Las alteraciones son análogas a las presentadas por los ratones nulos para *Notch* (Swiatek et al., 1994) lo que indica que Notch es un sustrato de ADAM10.

Se han generado ratones nulos condicionales bajo el promotor de la nestina (Jorissen et al., 2010) de forma que se limita la deficiencia de ADAM10 a las células progenitoras neurales y sus derivados a partir de E11.5, evitando así la temprana letalidad de los ratones *ADAM10*^{-/-}. Estos ratones condicionales presentan una diferenciación neuronal prematura y una migración neuronal aberrante en el telencéfalo, y descensos de la proliferación de los progenitores debido a que la vía de Notch está inactiva (Jorissen et al., 2010). Además, la inactivación condicional de ADAM10 bajo el promotor de la *CaMKII α* , que se expresa en neuronas del prosencéfalo especialmente del hipocampo a partir de los primeros días postnatales, interfiere con la plasticidad sináptica, causa defectos comportamentales e induce astrogliosis y microgliosis (Prox et al., 2013).

Se conocen pocos reguladores extracelulares de la actividad proteolítica de ADAM10 entre los que se incluyen TIMP1, TIMP3 y Sfrp1 (Amour et al., 2000; Brew and Nagase, 2010; Esteve et al., 2011a; Murphy, 2011; Rapti et al., 2008; Yu et al., 2000). Las TIMPs se caracterizan por tener un solo dominio NTR también presente en el extremo C-terminal de Sfrp1 (Banyai and Patthy, 1999). Nuestro laboratorio ha demostrado que Sfrp1 y Sfrp2 tienen una actividad similar a las TIMPs ya que regulan negativamente la actividad proteasa de ADAM10. Sfrp1 interacciona físicamente con ADAM10 regulando el desarrollo de la retina. Así, ratones *Sfrp1*^{-/-}; *Sfrp2*^{-/-} muestran alteraciones en la neurogénesis de la retina debido a que el receptor Notch está más proteolizado de forma transitoria y por lo tanto, se altera la cascada de señalización. Además, ensayos de *western blot* muestran también que el procesamiento de otros sustratos de ADAM10 como L1 y N-cadherina también está alterado en la retina durante el desarrollo (Esteve et al., 2011a; Marcos et al., 2015) afectando a los procesos de fasciculación de los axones de las células ganglionares de la retina.

En la misma línea, un reciente estudio demuestra que Sfrp3 reduce la actividad proteolítica de ADAM17 en los condrocitos afectando al procesamiento del receptor de interleuquina-6 (IL-6R). Análisis *in vitro* señalan que, mientras que en células HEK 293-T Sfrp3 suprime la actividad de ADAM17 previniendo la liberación del fragmento soluble sIL-6R que promueve una respuesta inflamatoria patológica, en una doble variante de Sfrp3 presente en el dominio NTR (que lleva al cambio de los aminoácidos R200W y R324G) y característica de

algunos pacientes con osteoartritis, se pierde la capacidad supresora sobre la actividad de ADAM17 (Oldefest et al., 2015).

De forma conjunta, estos datos demuestran que Sfrp1 es una proteína multifuncional con distintos mecanismos de acción, ya que además de modular positiva y negativamente la vía Wnt/ β -catenina, se une directamente a ADAM10 regulando su actividad proteolítica. La relación de la vía Wnt/ β -catenina y algunos sustratos de ADAM10, como el receptor Notch o N-cadherina, con la neurogénesis cortical hace plausible que Sfrp1 tenga papeles importantes en el desarrollo de la corteza cerebral.

1.2. Desarrollo de la corteza cerebral

1.2.1. Regionalización telencefálica

El telencéfalo se origina a partir del neuroepitelio localizado en la parte más anterior de la placa neural y da lugar, entre otras estructuras, a la corteza cerebral. Durante el desarrollo embrionario temprano y una vez que el primordio del telencéfalo está especificado, sufre varias sub-regionalizaciones en los tres ejes neuroanatómicos gracias a la acción de moléculas de señalización que regulan la expresión de distintos FT (Fig.2) (Caronia-Brown et al., 2014; Elsen et al., 2013; Martynoga et al., 2012).

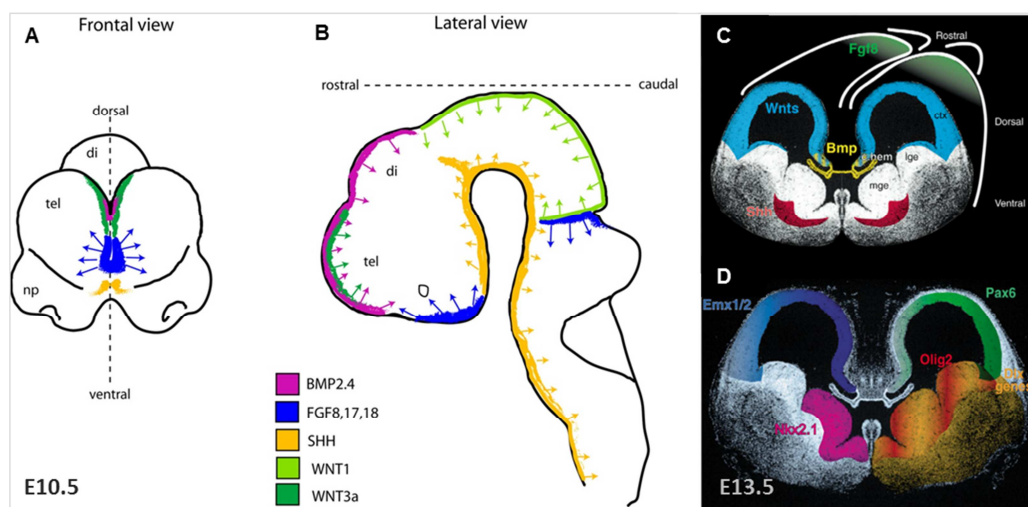


Fig. 2. Principales genes expresados durante el desarrollo telencefálico en ratón. Localización de algunos de los centros de señalización en E10.5 en vista frontal (A) y vista lateral (B). Durante los estadios tempranos, la mayor actividad de Fgf se localiza entre el hem cortical (verde; una fuente de Wnt y BMP) y la fuente de SHH ventral (amarillo). Principales morfógenos (C) y FT (D) en E13.5. Mientras Fgf se mantiene en las regiones más rostrales del telencéfalo en estadios intermedios, Wnt se expande del hem cortical hacia la región dorsal del palio y BMP también lo hace hacia el plexo coroideo (C). Los principales FT en el palio son Pax6 y Emx que presentan gradientes opuestos y en el subpalio se expresan los genes Dlx y Nkx (D). Figura adaptada a partir de (Stevens et al., 2010) (A y B) y (Götz y Sommer, 2005) (C y D).

En estadios muy tempranos el primordio telencefálico se subdivide en un dominio dorsal y uno ventral gracias al FT Gli3 y a *Sonic Hedgehog* (Shh), expresados en la región dorsal y en la línea media ventral, respectivamente (Hebert and Fishell, 2008). Posteriormente, estas regiones se transforman en palio y subpalio (Fig.3a). La expresión de distintos FT y morfógenos posibilitan que el palio adquiera su identidad (Fig.2c y 2d) (Gotz and Sommer, 2005;

2008; Muzio and Mallamaci, 2005). El neocórtex está formado longitudinalmente por columnas corticales interconectadas (Mountcastle, 1997; Rakic, 1988) mientras que transversalmente las neuronas se agrupan en seis capas (Douglas and Martin, 2004). El proceso de laminación comienza con las primeras neuronas en nacer, que migran y forman la preplaca, ésta se subdivide para generar la capa I (la más externa) y la subplaca (la más interna). Entre ambas comienza a formarse la placa cortical, que incluye el resto de capas, las cuales se generan siguiendo un patrón de dentro hacia fuera. Así las neuronas de las capas más profundas (VI y V) son las primeras en nacer y las que menor distancia deben migrar desde el lugar de generación hasta su posición final y las más superficiales (III y II) las últimas y las que migrarán una a una a una distancia mayor (Fig. 3b) (Greig et al., 2013; Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009; Rakic et al., 2009). Finalmente, en el **palio medial** se encuentra el primordio hipocampal, el *hem* cortical y el primordio del plexo coroideo (Subramanian et al., 2009) (Fig.3c). Del primordio hipocampal se originará el futuro hipocampo constituido por el giro dentado, rico en neuronas granulares, y las regiones del *cornu ammonis* (CA), con neuronas piramidales.

El primordio hipocampal (Fig. 3c) se especifica por la acción de moléculas de señalización secretadas por el *hem* cortical, un organizador transitorio requerido para la inducción y expansión hipocampal. El *hem* cortical expresa abundantemente genes Wnts, especialmente *Wnt2b*, *3a* y *5a* (Grove et al., 1998) y miembros de la familia de BMPs (Furuta et al., 1997). Estos grupos de moléculas de señalización son responsables de inducir en el territorio adyacente la formación del primordio del hipocampo y del plexo coroideo, respectivamente (Subramanian et al., 2009). Así, cuando el *hem* cortical se elimina genéticamente, gracias al cruce de ratones *Wnt3a^{-xneox-dt-a}* (donde la subunidad A de la toxina diftérica se inserta en el *locus* de *Wnt3a*; precedida por un codón de parada flanqueado por dos sitios LoxP que previenen la activación de la toxina) con la línea Emx1-IRES-Cre (que dirige la recombinación mediada por Cre en el telencéfalo dorsal, eliminando el codón de parada y activando la toxina), se producen defectos severos en el desarrollo del hipocampo y del plexo coroideo (Yoshida et al., 2006).

La inhibición de la vía Wnt/ β -catenina produce defectos severos en el desarrollo del hipocampo. Los ratones deficientes de *Wnt3a* carecen de un hipocampo organizado debido mayoritariamente a una drástica disminución en la tasa de proliferación. Estos ratones presentan un número menor de células progenitoras sin que estén aparentemente alterados los procesos de diferenciación o la muerte celular. Asimismo, estos animales carecen completamente de giro dentado, lo que indica que *Wnt3a* es necesario también para la especificación de este territorio (Lee et al., 2000).

En esta misma línea, los ratones nulos para *Lef1*, un FT diana de la vía canónica, o para *LRP6*, un co-receptor de Fz necesario para la activación de la vía Wnt/ β -catenina, muestran

defectos en el giro dentado (Galceran et al., 2000; Zhou et al., 2004). Los ratones nulos para *Lef1* muestran una reducción en la generación de las neuronas granulares. Igualmente, los mutantes de *LRP6* presentan un fenotipo similar a los mutantes de *Lef1* debido a un problema en la expansión del grupo de precursores granulares. El efecto parece ser exclusivo para esta población de células ya que en ambos casos, las células piramidales de CA no están afectadas. De forma similar, la inhibición de la vía canónica de Wnt a través de la expresión ectópica de *Dickkopf-related protein 1* (*Dkk1*) (una proteína que se une a los co-receptores LRP6) en progenitores corticales e hipocampales después de E11.5, provoca una gran reducción en el tamaño del giro dentado y en menor medida en las regiones CA (Solberg et al., 2008).

De forma complementaria, la activación ectópica y sostenida de la vía Wnt/ β -catenina induce características celulares hipocampales en el neocórtex. Así, ratones transgénicos *D6-Clef*, presentan a partir de E10.5 una activación de los genes diana de la vía Wnt/ β -catenina sin afectar a la adhesión celular. Estos ratones a P0 presentan parches ectópicos en la corteza lateral de células granulares del giro dentado marcadas con Prox1. Además, también se detectan células características de CA1, CA2 y CA3 en la corteza lateral como se demuestra a partir de la expresión de Neuropilina-2 (NP2), específica de las regiones CA1-CA3 y giro dentado, y del receptor de kainato KA1, específico de CA2-CA3 (Machon et al., 2007).

A pesar del creciente número de datos en torno a la regionalización hipocampal, aún es necesario determinar aspectos relativos a la regulación de la misma, cómo se integran las distintas señales en los progenitores neurales o cómo éstos restringen su identidad con el paso del tiempo (Hebert and Fishell, 2008).

1.2.2. Proliferación de los precursores neurales y neurogénesis

La regionalización del telencéfalo está íntimamente unida a la proliferación de los progenitores siendo ambos procesos esenciales para la formación de la corteza cerebral. La corticogénesis en ratón comienza entre E9.5-E10.5 coincidiendo con una abundante expresión del gen *Sfrp1* (Kim et al., 2001). En este proceso las neuronas de proyección glutamatérgicas derivan de progenitores neurales situados en el epitelio ventricular pseudoestratificado (Fig.3b). Estos progenitores neuroepiteliales se dividen simétricamente expandiendo su población y se transforman en células de glía radial (CGR) también conocidas como progenitores apicales, de las que derivan neuronas y células gliales. Durante el desarrollo cortical temprano las CGR sufren divisiones proliferativas simétricas, generando dos CGR y expandiendo así la población de progenitores (Takahashi et al., 1996). Con el paso del tiempo las CGR se dividen asimétricamente generando una CGR y una neurona o una célula progenitora intermedia (CPI) también conocida como progenitor basal (Kosodo and Huttner, 2009; Noctor et al., 2004). Las CPI amplifican la fuente neurogénica antes de la división neural terminal y pueden dividirse simétricamente una o dos veces produciendo parejas de CPI o de

neuronas (Florio and Huttner, 2014; Noctor et al., 2004). El incremento de las CPI puede estar detrás del importante desarrollo cortical humano (Lui et al., 2011) aunque otras células, como las células de glía radial basal ancladas exclusivamente a la superficie pial, también están implicadas (Borrell and Gotz, 2014; Florio and Huttner, 2014; Nonaka-Kinoshita et al., 2013).

Estas dos poblaciones de progenitores se distinguen al expresar distintos FT, así las CGR expresan Pax6, un FT que contiene un homeodominio responsable de conferir identidad glial (Quinn et al., 2007); mientras que las CPI expresan Tbr2, un FT con una caja T de unión al ADN (Papaioannou, 2014), responsable de especificar esta población (Sessa et al., 2008). Las CGR, las CPI y las neuronas se van generando progresivamente como se observa a partir de la expresión de los FT Pax6, Tbr2 y Tbr1, respectivamente (Englund et al., 2005). Sin embargo, los mecanismos moleculares responsables de la transición de CGR a CPI y a neurona son aún poco conocidos (Sun and Hevner, 2014)

Las CGR se localizan mayoritariamente en la zona ventricular (ZV) y las CPI en la zona subventricular (ZSV) (Fig.3b) (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009). Las CGR están ancladas a la ZV (apical) y a la superficie pial (basal) por lo que presentan polaridad y migración intercinética, mientras que las CPI no están ancladas, no presentan una polaridad apico-basal ni migración intercinética (Gal et al., 2006).

Finalmente, en relación a la generación de neuronas de proyección corticales la visión clásica propone que las neuronas de capas profundas se generan a partir de las CGR y las de las capas superficiales a partir de las CPI (Arnold et al., 2008; Cubelos et al., 2008; Nieto et al., 2004; Tarabykin et al., 2001); así, con el paso del tiempo la identidad final de las neuronas se iría restringiendo progresivamente (Desai and McConnell, 2000; Shen et al., 2006). Sin embargo, esta visión se ha modificado en los últimos años. A partir de análisis genéticos de mapeo de destino, se ha demostrado que CGR Cux2 positivas están especificadas intrínsecamente para generar neuronas de capas superficiales independientemente del nicho y del momento del nacimiento (Franco et al., 2012). Por tanto, la identidad molecular aseguraría el orden correcto de nacimiento de las neuronas generadas a partir de estos progenitores (Franco et al., 2012). Sin embargo, datos posteriores defienden que la identidad de los progenitores no está establecida en estadios tempranos (Guo et al., 2013) y que por lo tanto las CGR Cux2 positivas pueden generar tanto neuronas de capas superficiales como profundas y macroglía (Eckler et al., 2015). Por tanto, el debate continúa aún abierto en este sentido.

1.2.2.1. Identidad y proliferación de las CGR y las CPI: β -catenina

La β -catenina es una proteína multifuncional que regula la adhesión y polaridad celular además de la transcripción. Sus funciones varían a lo largo del desarrollo del SNC por el contexto espacio-temporal del desarrollo. La actividad β -catenina es muy dinámica espacial y temporalmente durante el desarrollo del telencéfalo (Maretto et al., 2003) como se observa a

partir del ratón reportero de la actividad transcripcional de β -catenina, donde la expresión de la β -galactosidasa está bajo el control de varios sitios de unión para LEF/TCF (con los cuales interacciona β -catenina). β -catenina favorece la auto-renovación de las CGR (Chenn and Walsh, 2002; Papachristou et al., 2014; Woodhead et al., 2006; Wrobel et al., 2007) mientras que su actividad en las CPI estimula su diferenciación (Munji et al., 2011; Mutch et al., 2010; Wrobel et al., 2007). Este efecto dual podría ser explicado por el contexto celular. En este sentido, se ha demostrado que en presencia de FGF2, un factor de crecimiento expresado en la ZV (Vaccarino et al., 1999), β -catenina promueve la reentrada en el ciclo celular y la auto-renovación de los progenitores, mientras que en ausencia de FGF2, favorece la diferenciación neuronal, debido a un efecto diferencial sobre el control de la transcripción (Israsena et al., 2004). Por tanto, para que las CPI proliferen correctamente es necesario que disminuya la actividad de la vía, dato que es consistente con el descenso del gradiente de la actividad de la vía β -catenina según avanza la neurogénesis (Machon et al., 2007).

a) β -catenina y la neurogénesis temprana

Durante la corticogénesis temprana β -catenina controla la generación de células progenitoras neurales al favorecer la reentrada en el ciclo celular de las CGR (Chenn and Walsh, 2002; Wrobel et al., 2007), bien regulando la transcripción o bien regulando los procesos de adhesión célula-célula. La inhibición de la vía β -catenina mediante la electroporación de una forma dominante negativa de TCF4 en E14.5, induce la salida prematura de los precursores neurales del ciclo celular y su diferenciación a neuronas que migran a la placa cortical (Woodhead et al., 2006). En estadios tempranos también se ha descrito que la sobre-expresión de Wnt7b en progenitores neurales provoca un descenso en el número de CPI y de neuronas postmitóticas (Papachristou et al., 2014). Por tanto, en su conjunto estos datos sugieren que la β -catenina controla de forma autónoma celular la producción de neuronas corticales regulando así el tamaño de la corteza cerebral.

Además, la participación de β -catenina en la adhesión célula-célula permite la regulación de la morfogénesis y neurogénesis de los precursores neurales de forma independiente a la señalización por Wnt (Junghans et al., 2005). β -catenina y N-cadherina interaccionan manteniendo la adhesión de las CGR y preservando el nicho neurogénico de las CGR (Zhang et al., 2010). En ratones mutantes con una expresión reducida de *N-cadherina* las células del nicho pierden adhesión celular lo que les conduce a una salida precoz del ciclo celular, diferenciación neuronal y migración. Estas células presentan descensos en la regulación transcripcional de genes diana de β -catenina a través de la vía Akt, e independientemente de Wnt (Zhang et al., 2010). Efectos similares se observan tras la inhibición de Akt debido a una disminución en la fosforilación de GSK3- β (Serina9) y de β -catenina (Serina 552) (Zhang et al., 2013). Pero la regulación es más compleja, ya que ADAM10

procesa N-cadherina y conduce a una redistribución de β -catenina desde la superficie celular hacia el citoplasma lo que favorece su actividad transcripcional (Reiss et al., 2005).

Por tanto, el control de la actividad transcripcional de β -catenina además de ser modulado por los ligandos Wnt también puede regularse por mecanismos independientes de Wnt. Todos estos datos reflejan la interrelación entre los procesos de adhesión y regulación transcripcional mediados por β -catenina y la dificultad para separarlos.

b) β -catenina y la neurogénesis avanzada

La activación de la vía β -catenina se reduce progresivamente a medida que la neurogénesis avanza (Machon et al., 2007; Mutch et al., 2010). Se han descrito resultados contradictorios, donde tanto la activación (Hirabayashi et al., 2004; Kuwahara et al., 2010) como la inhibición de la vía (Viti et al., 2003; Woodhead et al., 2006) favorecen la diferenciación neuronal; aunque es posible, que detrás de esta contradicción estén los distintos abordajes metodológicos o la ventana temporal.

β -catenina participa en la transición de las CGR a CPI, así una expresión sostenida de β -catenina provoca un aumento en el número de células Pax6 positivas en proliferación y un descenso en el de Tbr2 positivas (Kuwahara et al., 2010; Wrobel et al., 2007). De forma complementaria, el número de CPI aumenta en ratones con una inactivación condicional de β -catenina bajo el promotor de nestina, gen específico de los progenitores neurales; mientras que esta población se reduce en ratones con expresión condicional de β -catenina estabilizada (no fosforilable y por lo tanto no degradable) bajo el mismo promotor (Mutch et al., 2010). Otros estudios describen que el aumento de actividad de la vía β -catenina provoca descensos en el número de CPI, las cuales diferencian prematuramente en neuronas y se acumulan en la ZSV (Munji et al., 2011). Sin embargo, aunque los datos apuntan hacia una regulación negativa de β -catenina sobre las CPI, la infección retroviral de β -catenina estabilizada en E12.5 provoca un incremento en el número de CPI (Kuwahara et al., 2010). Esta contradicción puede deberse, por ejemplo, al momento en el que se aumentan los niveles de β -catenina, que en este último estudio se realiza en un estadio posterior al resto (Kuwahara et al., 2010; Mutch et al., 2010).

1.2.2.2. Identidad y proliferación de las CGR y las CPI: la vía de Notch

La vía Notch regula la proliferación de progenitores y la corticogénesis. Así, su activación mantiene a las células en un estado proliferativo y permite conservar la identidad celular de las CGR (Gaiano et al., 2000). Esta vía es compleja y está regulada en múltiples puntos, por eso dependiendo del contexto celular la actividad de la vía Notch varía. En mamíferos hay cuatro receptores Notch 1-4 con papeles redundantes. Cuando el ligando se une al receptor Notch, éste se procesa secuencialmente primero por ADAM10 y después por el complejo γ -secretasa, liberando el dominio de Notch intracelular (NICD). En la vía canónica NICD se transloca al núcleo y activa al regulador de la transcripción CSL (CBF1 en humanos,

Su(H) en *Drosophila* y LAG1 en *C.Elegans*) también conocido como RBP-Jk en mamíferos. En ausencia de NICD, CSL actúa como un represor transcripcional. Cuando NICD entra en el núcleo, el complejo represor recluta coactivadores y se activa la transcripción de los genes *Hes* y *Hey* que a su vez reprimen genes proneurales como *Ascl1* (Mash1) y *neurogenina 1 y 2*. También inhibe la transcripción de los ligandos canónicos de Notch, como son Delta-like (Dll1,3,4), Jagged1 y 2, autorregulando negativamente la vía (Fig. 4) (Kopan and Ilagan, 2009).

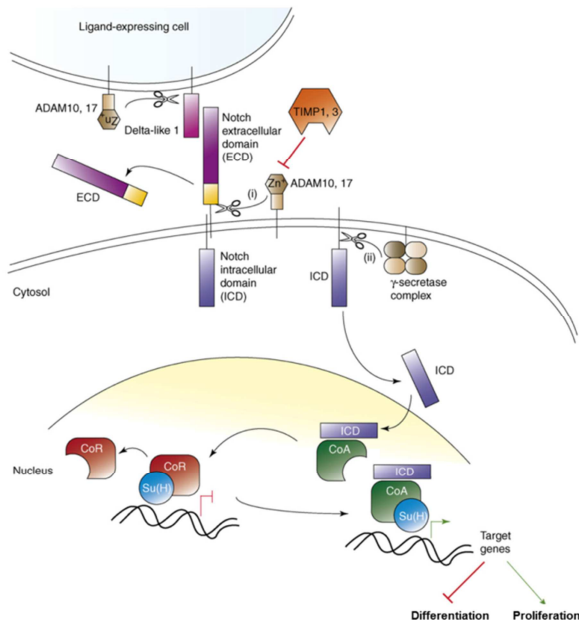


Fig. 4. Vía de Notch. El receptor Notch consiste en un dominio extracelular y otro intracelular que son secuencialmente procesados por proteasas. La interacción entre un ligando y el receptor Notch favorece el procesamiento por ADAM10 (que es inhibido a su vez por las TIMP) permitiendo que el complejo intracelular γ-secretasa procese el dominio intracelular para generar el dominio de Notch intracelular (NICD). NICD se transloca al núcleo y favorece la transcripción de genes de proliferación e inhibe la de los genes de diferenciación. Figura adaptada a partir de (Murphy et al., 2008).

Los FT *Hes1* y *Hes5* mantienen a los progenitores neurales en un estado proliferativo inhibiendo su diferenciación, así ratones deficientes en *Hes1* y *Hes5* presentan una neurogénesis prematura (Hatakeyama and Kageyama, 2006; Imayoshi et al., 2008; Ishibashi et al., 1995; Kageyama et al., 2008a; Kageyama et al., 2008b; Ross et al., 2003) mientras que su sobre-expresión previene la neurogénesis (Nakamura et al., 2000; Ohtsuka et al., 1999; Ohtsuka et al., 2001). Aunque *Hes1* y *Hes5* son dos efectores de la vía de Notch, se ha demostrado que *Hes1* comienza a expresarse antes de que lo hagan los componentes de la vía de señalización de Notch (Hatakeyama et al., 2004), lo que indica que *Hes1* es diana también de otras vías de señalización. En este sentido la expresión de *Hes1* parece estar regulada por Lhx2 (Chou and O'Leary, 2013), la vía de FGF (Ogata et al., 2011; Shimizu et al., 2008; Tsai and Kim, 2005), la vía de Wnt (Shimizu et al., 2008) o la vía de Shh (Dave et al., 2011; Ingram et al., 2008), entre otros. Por el contrario, la transcripción de *Hes5* es más tardía y parece ser diana exclusiva de la vía de Notch (Hatakeyama et al., 2004).

La vía de Notch presenta un gradiente opuesto apico-basal para receptores y ligandos en la retina de pez cebra (Del Bene et al., 2008). De forma similar, en el telencéfalo de ratón los receptores Notch se localizan en los progenitores de la ZV y los ligandos en las CPI de la ZSV y las neuronas recién nacidas de la placa cortical (Yoon et al., 2008). Los ligandos Notch también pueden ser procesados proteolíticamente por ADAM10 y ADAM17 y por el complejo

γ -secretasa (Fig. 4) (Yang et al., 2006). Este procesamiento disminuye la cantidad de ligando disponible para la activación de la vía, dado que se reduce su presencia en la superficie celular lo que produce un aumento en la diferenciación celular y una disminución en la proliferación (Muraguchi et al., 2007). Aún no está claro si el ectodominio de los ligandos tiene o no actividad intrínseca (D'Souza et al., 2008).

La infección retroviral de Notch1 activado, el fragmento NICD, en el prosencéfalo de embriones de ratón de E9.5 promueve la transición de progenitor neuroepitelial a CGR. Así las células infectadas adquieren la morfología y las características moleculares de glía radial (Gaiano et al., 2000). Notch además de mantener la auto-renovación de los progenitores neurales en estadios tempranos, tiene otras funciones en fases posteriores ya que se ha observado que la activación de Notch favorece la diferenciación glial, a expensas de la población neuronal (Gaiano and Fishell, 2002).

Asimismo, esta vía inhibe el paso de CGR a CPI (Mizutani et al., 2007; Ohata et al., 2011). El mecanismo a través del cual Notch actúa sobre la proliferación parece variar en función del tipo de progenitor. Así, en las CGR actúan a través de mecanismos dependientes de CSL/CBF1 mientras que en las CPI usan mecanismos independientes de CSL/CBF1 (Mizutani et al., 2007). Mediante ensayos de neuroesferas se demuestra que el efecto de la eliminación de CSL/CBF1 en progenitores neocorticales produce un desplazamiento desde la identidad de CGR a CPI (Gao et al., 2009). De forma similar, la mutación *mosaic eyes*^{rw306} en pez cebra que reduce la actividad de Notch produce un incremento en el número de mitosis basales Tbr2 positivas en el rombencéfalo que se revierte tras la inyección de ARNm de *NICD*, lo que indica que la señalización Notch restringe las mitosis neuroepiteliales en el área apical (Ohata et al., 2011).

De los datos expuestos anteriormente se infiere la extremada complejidad existente detrás del desarrollo cortical. La expresión dinámica de *Sfrp1* a lo largo del desarrollo y su capacidad para modular al menos la vía Wnt/ β -catenina y la actividad de ADAM10 (Esteve et al., 2011a; Esteve et al., 2011b) sugiere *Sfrp1* podría formar parte de la red que modula la corticogénesis. Pero la función de esta molécula puede ir más allá del desarrollo influyendo sobre la homeostasis del tejido adulto. En este sentido, aunque la expresión de *Sfrp1* está muy reducida durante la edad adulta (Augustine et al., 2001) se incrementa en el curso de la EA (Blalock et al., 2004). Debido al papel de *Sfrp1* sobre la actividad de ADAM10 y a que uno de los sustratos de esta enzima es APP, es interesante y potencialmente útil estudiar el efecto de *Sfrp1* sobre el procesamiento de APP así como sus posibles implicaciones sobre la EA.

1.3. Enfermedad de Alzheimer (EA)

1.3.1. Principales características de la EA

En 1906 Alois Alzheimer describió una nueva entidad patológica con dos características anatomopatológicas distintivas presentes en el cerebro, las placas seniles amiloides y los

ovillos neurofibrilares, que pasó a denominarse EA. Estudios posteriores han confirmado la presencia de ambos rasgos ampliándose el foco de estudio al estado de la sinapsis, especialmente la transmisión colinérgica, a las alteraciones asociadas con las mitocondrias, los procesos inflamatorios o alteraciones lipídicas (Querfurth and LaFerla, 2010).

La EA es una enfermedad neurodegenerativa que cursa con una sintomatología neuropsicológica cortical. Inicialmente se detecta por fallos en memoria, a los que siguen alteraciones en el lenguaje, en la percepción o en las funciones ejecutivas (Weintraub et al., 2012) culminando en demencia. Existen dos formas de EA, la forma familiar que afecta aproximadamente al 5% de los pacientes y se caracteriza por la presencia de mutaciones en los genes APP y presenilina1 y 2 (PS1 y PS2) (Selkoe and Kopan, 2003). Normalmente se manifiesta en edades tempranas (antes de los 65 años). Sin embargo, en la gran mayoría de los casos los primeros síntomas aparecen más tardíamente y constituyen la EA esporádica o de inicio tardío donde la edad es el mayor factor de riesgo. El origen es desconocido y seguramente multifactorial, así junto con factores de predisposición genética, como el alelo $\epsilon 4$ del gen de la apolipoproteína E4 (APOE4), se barajan otras variables como son el síndrome metabólico, los hábitos dietéticos o la inflamación periférica (Bu, 2009). A pesar del componente ambiental, la heredabilidad está entre el 60-80% (Bertram et al., 2010; Gatz et al., 2006).

Según la hipótesis de la cascada amiloide (Glennner and Wong, 1984) la presencia exacerbada del péptido β amiloide ($A\beta$) es la causa primaria de la EA siendo el resto de las alteraciones, incluidos la formación de ovillos neurofibrilares o los daños sinápticos, resultado de un fallo en el balance de producción, agregación y/o eliminación del péptido $A\beta$ (Hardy and Selkoe, 2002). Las placas seniles amiloides son depósitos extracelulares donde mayoritariamente se acumula el péptido $A\beta$, lípidos, proteínas y metales libres (Benilova et al., 2012). Las placas podrían funcionar como reservorios de los oligómeros bioactivos contribuyendo a la pérdida de las sinapsis y a la muerte neuronal en humanos a lo largo del curso de la enfermedad, especialmente en el hipocampo y en la neocorteza (Haass and Selkoe, 2007). Por ese motivo, se detecta un adelgazamiento del tejido nervioso en los pacientes con EA junto con un aumento en el tamaño de los ventrículos cerebrales (Karow et al., 2010).

La hipótesis amiloidea, a pesar de ser la más aceptada, no está exenta de críticas. Entre las mayores objeciones se encuentra la falta de correlación entre el número de placas y la severidad en los daños cognitivos encontrados en cerebros humanos, además de la presencia de placas en personas mayores cognitivamente normales (Herrup, 2015). Sin embargo, las personas diagnosticadas de EA presentan un número mayor de placas seniles amiloides, visualizadas a través de imágenes de tomografía por emisión de positrones (PET) con el marcador *Pittsburgh compound B* (PIB) (Mathis et al., 2002) comparados con personas sanas o con daño cognitivo leve (Johnson et al., 2012). Además, aunque existe una robusta correlación

entre los niveles de oligómeros A β y los daños cognitivos (McLean et al., 1999), ensayos clínicos con anticuerpos destinados a neutralizar el péptido A β han fracasado o producen sólo un reducido efecto poniendo en entredicho esta hipótesis, aunque los últimos datos presentados con los fármacos solanezumab® y aducanumab® suponen un cierto optimismo prudente (Reardon, 2015; Underwood, 2015). Se postula que detrás de este efecto tan limitado puede esconderse una intervención demasiado tardía (Teich and Arancio, 2012) o que los fenotipos observados en ratones transgénicos de APP pueden ser artefactuales debido a los altos niveles de la sobre-expresión APP (Saito et al., 2014). En este sentido, se ha descrito que en pacientes con EA familiar se detectan cambios en distintos biomarcadores bioquímicos (péptido A β 42 y la proteína Tau) en el líquido céfalo-raquídeo (LCR), depósitos amiloides cerebrales y modificaciones en el metabolismo de la glucosa (Bateman et al., 2012), entre 15 y 10 años antes de la aparición de los síntomas. Lo que sugiere un importante desfase temporal entre las alteraciones bioquímicas/anatomopatológicas y las funcionales, indicando una progresión lenta de la enfermedad.

Con todo esto, aunque no esté totalmente demostrada la naturaleza causal de la hipótesis amiloidea, las placas de β amiloide se relacionan con la EA. Por tanto, puede ser de gran utilidad estudiar el mecanismo que regula la generación del péptido A β a partir de APP así como las posibles variables relacionadas con dicho mecanismo.

1.3.2. La proteína precursora de amiloide (APP) y su procesamiento

El gen de *APP* se encuentra en el cromosoma 21q21 en humanos y codifica para una proteína integral de membrana que puede expresarse en tres isoformas, APP695, APP751 y APP770. La primera de ellas se expresa mayoritariamente en neuronas, mientras que las otras dos se pueden localizar en muchos otros tejidos (Gralle and Ferreira, 2007). APP está implicada en la generación, diferenciación y migración de las neuronas durante el desarrollo (Nicolas and Hassan, 2014). Sin embargo, el fenotipo sutil que presentan ratones deficientes en APP, que muestran principalmente una reducción del peso corporal, de la actividad locomotora y del tamaño de las comisuras, hace pensar en un papel permisivo más que instructivo para esta proteína (Nicolas and Hassan, 2014). Además, se relaciona con la adhesión célula-célula (Gralle and Ferreira, 2007) y modula la degradación de β -catenina, ya que se ha descrito que la presencia de APP facilita la eliminación de β -catenina al favorecer la fosforilación de GSK-3 β sobre los aminoácidos S33/S37/T41 y de CK1 sobre S45 (Chen and Bodles, 2007). La proteína APP murina y humana difieren en tres aminoácidos en la secuencia A β (Kuhn et al., 2010).

La proteína APP es susceptible de ser proteolizada a través de al menos dos mecanismos diferentes, la vía amiloidogénica o la vía no amiloidogénica (Fig.5). En la vía amiloidogénica una β secretasa, la enzima 1 que corta en el sitio β de APP (BACE1), proteoliza la proteína generando dos fragmentos, un fragmento soluble β -APP (sAPP β) y un fragmento β

terminal carboxílico (β -CTF o C99). A continuación, el complejo γ -secretasa, compuesto principalmente por la PS1, PS2, *anterior pharynx-defective1* (APH1) y nicastrina (Zhang et al., 2011) corta β -CTF formándose el péptido A β y el dominio intracelular de APP (AICD) (Benilova and De Strooper, 2011). Existen distintas formas del péptido A β , las formas largas son más hidrofóbicas y por ese motivo se retienen más en el sitio activo de la proteasa PS1, siendo así procesadas sucesivamente (Wolfe, 2007). Varias mutaciones en PS1 disminuyen su eficiencia catalítica y llevan a la liberación de fragmentos A β de mayor tamaño, los cuales son más tóxicos (Iizuka et al., 1995; Keller et al., 2010; Parvathy et al., 2001; Welander et al., 2009).

La vida media del péptido A β normalmente es corta debido a su rápida eliminación a través de dos vías mayoritarias (Cirrito et al., 2003). La primera de ellas está mediada a través de su unión con los receptores APOE, característica de neuronas y glía, del drenaje a través del fluido intersticial y de la barrera hematoencefálica (Bu, 2009). La segunda vía es a través de degradación proteolítica mediada por endopeptidasas como son la nepresilina o metaloendopeptidasa o la enzima de degradación de la insulina (IDE) (Leissring, 2008).

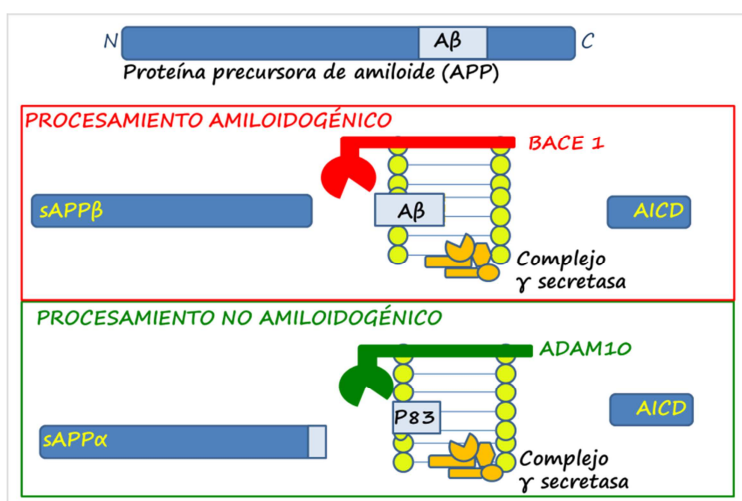


Fig. 5. Esquema de las vías de procesamiento de APP. En el procesamiento amiloidogénico la actividad proteasa de BACE1 y el complejo γ -secretasa favorece la generación del fragmento A β , mientras que durante el procesamiento no amiloidogénico, ADAM10 al cortar dentro de la secuencia del péptido A β evita su generación favoreciendo la generación del fragmento sAPP α . Esquema no dibujado en proporción.

Alternativamente, APP puede ser procesada a través de la vía no amiloidogénica (Fig 5). En este caso la α -secretasa ADAM10 proteoliza de forma constitutiva APP dentro de la secuencia A β (Kuhn et al., 2010) impidiendo así la formación de los péptidos A β y generando dos fragmentos, el fragmento soluble α -APP (sAPP α) y el fragmento α terminal carboxílico (α -CTF o C83). Posteriormente, este último fragmento se procesa por el complejo γ -secretasa y se genera el péptido P83 y AICD (Zhang et al., 2011). Es importante destacar que la mayoría de APP se procesa a través de la vía no amiloidogénica generándose niveles bajos de péptidos A β de forma constitutiva (Obregon et al., 2012) con funciones neurotróficas y potenciadoras de los mecanismo de memoria (Kamenetz et al., 2003; Puzzo et al., 2008; Puzzo et al., 2012). En dos modelos de ratones condicionales nulos de *ADAM10*, uno bajo el promotor de la nestina y el otro bajo el promotor *CaMKII α* , se describen alteraciones en el procesamiento no

amilioidogénico de APP e incrementos en los niveles del péptido A β comparado con los ratones controles (Jorissen et al., 2010; Prox et al., 2013).

Las α y β secretasas actúan en distintos compartimentos celulares. Así la primera se localiza en la membrana plasmática (Sisodia, 1992) y en el Trans-Golgi (Koo and Squazzo, 1994; Skovronsky et al., 2000) mientras que la segunda actúa principalmente en el endosoma (Koo and Squazzo, 1994) y en menor medida en la región Trans-Golgi (Haass et al., 1993; Haass et al., 1995). Se ha observado que la expresión de proteína BACE1 se encuentra aumentada en la corteza temporal y el hipocampo de pacientes con EA (Li et al., 2004) y los de ADAM10 disminuidos en pacientes con EA tanto en plaquetas (Colciaghi et al., 2002) como en las neuronas (Bernstein et al., 2003). Además, estos pacientes presentan descensos en el ARNm y por lo tanto en la actividad proteolítica de ADAM10 en la corteza cerebral (Kim et al., 2009; Marcinkiewicz and Seidah, 2000; Suh et al., 2013; Tyler et al., 2002).

Las α y β secretasas compiten por el mismo sustrato, así una mayor actividad de ADAM10 favorece la generación de α APP y reduce la del péptido A β (Lichtenthaler, 2011). En ratones que sobre-expresan BACE1 o el alelo sueco de APP (K594M/N595L) que favorece el corte por la β -secretasa, la proteína APP es procesada antes de llegar a la membrana plasmática, lo que induce un aumento en la generación del péptido A β y una disminución en el fragmento α APP (Haass et al., 1995; Kuhn et al., 2010). Otros abordajes genéticos, a través de la sobre-expresión de la proteína ADAM10 (Postina et al., 2004) y del uso de ratones dobles transgénicos que expresan una forma catalíticamente inactiva de ADAM10 bajo el promotor de *thy1* que se expresa en neuronas diferenciadas junto a la mutación APP_[V717I] (Postina et al., 2004) o abordajes farmacológicos, mediante el uso de agonistas muscarínicos (Bandyopadhyay et al., 2007), apoyan la competición por el sustrato APP entre las α y β secretasas. Además, la disminución de ADAM10, mediante ARNs interferentes en neuronas corticales primarias de ratones E16.5 que expresan APP endógeno, conlleva un descenso en el fragmento α APP junto a un incremento moderado del fragmento β APP y el péptido A β (Kuhn et al., 2010).

Un mecanismo adicional de regulación entre las dos vías parece estar mediado por la interacción entre α APP y BACE1, que llevaría a una disminución de la actividad de BACE1 y por lo tanto a una reducción en el procesamiento amiloidogénico de APP (Obregon et al., 2012).

Por el contrario, existen datos que no apoyan la competición entre estas dos vías. Por ejemplo, cultivos primarios de neuronas derivadas a partir de embriones (E14.5) con una inactivación condicional de ADAM10 junto a la expresión de la forma humana de APP (obtenida mediante infección viral), muestran una reducción en los niveles tanto de α APP como de β APP y A β (Jorissen et al., 2010). Además, estudios llevados a cabo en la línea HEK 293-T y el neuroblastoma SH-SY5Y no muestran competición (Kuhn et al., 2010). Estas discrepancias sobre la competición de las secretasas pueden residir en el uso de modelos no

fisiológicos, como la sobreexpresión de la β secretasa o el uso de líneas celulares en las cuales la actividad de la β secretasa es menor que en neuronas (Lichtenthaler, 2011).

Las funciones de los fragmentos solubles obtenidos por el procesamiento de APP son muy diferentes, así el fragmento **sAPP β** induce muerte neuronal afectando a los procesos neurodegenerativos (Nikolaev et al., 2009) mientras que el fragmento **sAPP α** tiene un papel neurotrófico y neuroprotector que favorece la plasticidad y supervivencia neuronal e inhibe la excitotoxicidad (Caille et al., 2004; Furukawa et al., 1996; Mattson, 1997; Mattson et al., 1993). Este fragmento además es suficiente para rescatar los defectos fenotípicos del ratón nulo de APP como son la pérdida de peso, alteraciones comportamentales y fallos en la potenciación a largo plazo (Ring et al., 2007).

La reducción de la actividad de ADAM10 disminuye el fragmento sAPP α favoreciendo la amiloidosis así como defectos en memoria (Epis et al., 2010; Suh et al., 2013). Varios artículos indican que existe una reducción de sAPP α en el LCR de pacientes con EA (Almkvist et al., 1997; Fellgiebel et al., 2009; Sennvik et al., 2000). Todos estos datos sugieren que la inhibición de ADAM10 puede jugar un papel en la patogénesis de la EA, bien por aumentar A β y sAPP β , bien por disminuir sAPP α o bien por ambas razones (Kim et al., 2009).

En cuanto al papel patológico del **péptido A β** , inicialmente se consideró que las placas compactas extracelulares interferían en la comunicación neural siendo la causa primaria de la neurodegeneración. Sin embargo, el péptido A β puede encontrarse en un estado monomérico, oligomérico, fibrilar, formando placas difusas o en placas compactas (Jin et al., 2011; Pham et al., 2010; Pithadia and Lim, 2012; Walsh and Selkoe, 2007). Recientemente se ha propuesto que los oligómeros, y más concretamente los dímeros de A β , son los causantes de la neurodegeneración en la EA (Jin et al., 2011). Además, hay que añadir que la eliminación del péptido A β por microglía está disminuida en los modelos de EA (Akiyama et al., 2000).

El péptido A β cuenta con varias formas debido a un procesamiento secuencial por parte de PS1 (Benilova and De Strooper, 2011). La forma larga A β 42 es más tóxica, hidrofóbica y tiene mayor tendencia a agregarse que la forma corta A β 40 (Hardy and Selkoe, 2002). Además, se ha descrito que aquellos pacientes que presentan una alto cociente A β 42/A β 40 tienen peor pronóstico (Wolfe, 2007). Además, ciertas formas atípicas de EA correlacionan con incrementos en A β 43 (Godbolt et al., 2004) siendo esta forma peptídica suficiente para acelerar la amiloidosis e inducir la formación de placas (Saito et al., 2011).

Por tanto, es posible que Sfrp1, debido a su implicación como modulador negativo de la actividad de ADAM10 (Esteve et al., 2011a) y al aumento en su nivel de expresión en pacientes con EA (Blalock et al., 2004), juegue un papel potencial en esta enfermedad. Lo que nos lleva a preguntarnos sobre la función de esta proteína en el procesamiento de APP y las posibles consecuencias comportamentales.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Sfrp1 es un regulador multifuncional de la comunicación célula-célula que modula la señalización Wnt y la actividad de distintas metaloproteinasas como ADAM10. *Sfrp1* se expresa en el telencéfalo de ratón durante el desarrollo embrionario y en la corteza cerebral durante la edad adulta. Sin embargo, el papel que juega esta proteína en la corteza cerebral de mamíferos no ha sido analizado hasta el momento. Por ello, el objetivo general de esta tesis es analizar la función de Sfrp1 en el desarrollo y mantenimiento de la corteza cerebral, usando como sistema modelo ratones silvestres y APP/PS1 a los que se les ha eliminado genéticamente Sfrp1. El uso de ratones APP/PS1 permite analizar el procesamiento de APP y la acumulación de placas amiloides.

Este objetivo general se concreta en los siguientes objetivos específicos:

- 1) Caracterizar fenotípica y molecularmente el hipocampo y neocórtex de ratones deficientes en *Sfrp1* durante la etapa embrionaria.
- 2) Analizar el papel Sfrp1 en el procesamiento de APP y por tanto su potencial contribución a la patología amiloidea característica de la EA.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Animales

En esta tesis hemos utilizado varios modelos de animales. En primer lugar, para los análisis embrionarios usamos ratones deficientes en *Sfrp1* en el fondo genético de 129/C57BL/6J y como controles ratones 129/C57BL/6J. Los ratones mutantes *Sfrp1*^{-/-} fueron generados y cedidos a nuestro laboratorio por el grupo de Shimono. Los ratones se generaron sustituyendo parte del primer exón por un casete lacZ (Satoh et al., 2006). Ensayos de actividad de β-galactosidasa (β-gal) revelaron que la expresión de este reportero mimetizaba la expresión endógena de *Sfrp1* (Satoh et al., 2006). Para los análisis embrionarios las hembras fueron cruzadas con los machos a última hora de la tarde. Por la mañana se retiró el macho de la jaula y se observó si la hembra tenía tapón vaginal. Aquellas hembras que presentaron dicho tapón se consideraron preñadas de embriones E0.5, contabilizando los días desde ese momento hasta la edad deseada. Para la extracción de embriones, las madres fueron sacrificadas por dislocación cervical. Después se aislaron los embriones de los cuernos uterinos y se eliminaron las membranas que los recubrían. Para los análisis postnatales el momento del nacimiento se consideró como P0 contabilizando desde ese momento hasta la edad deseada.

En segundo lugar, para analizar el la función de *Sfrp1* sobre el procesamiento de APP usamos ratones *Sfrp1*^{-/-} de 6 y 14 meses de edad y como modelo murino de EA el doble transgénico APP695SWE/PS1/ΔE9 cedido por I. Torres-Alemán y procedente previamente de Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine). Este ratón fue generado a partir de la co-inyección de dos constructos (el quimérico de ratón/humano con la mutación humana Sueca de APP695 (K594M/N595L) y la eliminación del exón 9 (ΔE9) de PS1) conducidos ambos bajo el promotor murino del prión (Prp), que se expresa mayoritariamente en tejido nervioso y otros tejidos (cardiaco, hepático, pancreático y muscular) (Jankowsky et al., 2004b; Jankowsky et al., 2001). La mutación Sueca de APP (Mo/HuAPP695swe) favorece el corte por la β-secretasa (Haass et al., 1995; Hardy and Selkoe, 2002; Jankowsky et al., 2004a; Kuhn et al., 2010) y la mutación ΔE9 de PS1 desplaza la ratio de Aβ 40:42 a favor de Aβ 42 (Haass et al., 1995; Hardy and Selkoe, 2002; Jankowsky et al., 2004a; Kuhn et al., 2010), una forma más tóxica que tiene mayor tendencia a agregarse (Haass et al., 1995; Hardy and Selkoe, 2002; Jankowsky et al., 2004a; Kuhn et al., 2010). Así, ambas mutaciones aceleran el depósito del péptido Aβ en forma de placas siendo éstas evidentes a los 4 meses de edad (Garcia-Alloza et al., 2006). Los ratones APP/PS1 se cruzaron con ratones mutantes *Sfrp1*^{+/-}, obteniéndose así ratones APP/PS1/*Sfrp1*^{+/-} (a los que nombraremos como APP/PS1) y APP/PS1/*Sfrp1*^{-/-}. Como controles de estos animales se usaron ratones C57BL/6J. El estudio se realizó con ratones machos entre 4.5 y 9 meses de edad.

Los animales fueron estabulados en un ciclo normal de 12 horas de luz en una sala con temperatura (22 ± 1 °C) y humedad ($52 \pm 2\%$) controlada. Todos los procedimientos siguieron la normativa Española (ley 32/2007) y Europea (EU directive 86/609, EU decree 2001-486) que regula la investigación con animales.

3.2. Inmunohistoquímica e hibridación *in situ*

Los embriones entre E10.5-E14.5 fueron fijados por inmersión en 4% de paraformaldehído (PFA) en tampón fosfato 0,1M (peso/volumen) durante tres horas a temperatura ambiente. Los embriones de mayor edad y animales postnatales-adultos fueron perfundidos transcárdialmente con la misma solución de fijación y postfijados durante 3 horas a temperatura ambiente. El tejido se lavó con tampón fosfato-salino (PBS) durante 24 horas tras lo cual se introdujo en una solución de sacarosa al 30% en PBS (peso/volumen). Finalmente los cerebros fueron embebidos y congelados en una solución de 7.5% gelatina en 15% de sacarosa (peso/volumen) y posteriormente cortados con criostato.

Para los ensayos de **inmunohistoquímica**, las secciones de criostato de 10-15 μ m fueron lavadas 3 veces con PBS durante 10 minutos. Algunas secciones previamente fueron hervidas para el desenmascaramiento del antígeno usando una olla a presión (Biocare Medical) a 115° en 10 mM de tampón citrato (pH 6) durante 20 minutos (Sfrp1) o 30 segundos (PH3). Después se bloqueó la peroxidasa endógena en una solución de 3% de H₂O₂ en metanol durante 10 minutos, tras los cuales el tejido fue lavado 3 veces con 0,1% TX-100 en PBS (peso/volumen) durante 10 minutos. Las secciones fueron bloqueadas (tampón de bloqueo compuesto de PBS 0,1% TX-100, 5% FCS y de 0,1% BSA) al menos durante una hora a temperatura ambiente, e incubadas posteriormente con el anticuerpo primario en tampón de bloqueo durante una noche a 4°C. Los anticuerpos primarios usados fueron anti-Sfrp1 (1:1000, Abcam), anti-phospho-histone H3 (ser10) (PH3) (1:1000, Millipore), anti-Pax6 (1:500, Covance), anti-Tbr2 (1:1000, Abcam), anti-Tbr1 (1:1000, Chemicon), anti-Tubulin (Tuj1) (1:3000, Sigma), anti-N-cadherin C-terminal (1:500 Invitrogen), anti-NeuN (1:500, Chemicon), anti-CTIP2 (1:500, Abcam), anti-Cux1 (1:500, Santa Cruz), anti-APP clon 22C11 (1:1000, Chemicon), anti-A β (1:500, Millipore), anti sAPP α (1:500, Covance), anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) (1:3000, Dako), anti-CD11b conjugado con biotina (1:100, BD Biosciences).

Tras la incubación con el anticuerpo primario las secciones fueron lavadas con PBS 0.1% TX-100 tres veces durante 10 minutos cada vez. Algunas secciones se incubaron con los anticuerpos secundarios acoplados a biotina (1:500, Jackson-InmunoResearch) en tampón de bloqueo amplificándose con Estreptavidina conjugada con peroxidasa (1:500, Jackson-InmunoResearch). El revelado se hizo con DAB (Sigma) o con el reactivo tiramida cianina 3 (1:100, Perkin Elmer) (secciones incubadas con Sfrp1 y sAPP α) para amplificar la señal de

dichos anticuerpos. En algunos casos (secciones incubadas con GFP, Top Red, Tuj1, APP y A β) se usaron anticuerpos secundarios conjugados con Alexa 594 (1:3000, Molecular probes) o Alexa 488 (1:3000, Molecular probes).

Para los estudios con **Bromodeoxyuridina (BrdU)**, se inyectó BrdU (50 μ g/g de peso corporal) disuelto en salino a las madres preñadas sacrificándolas 1 hora después. Los embriones se diseccionaron inmediatamente en PBS frío y se fijaron en 4% de PFA. Posteriormente los cerebros se introdujeron en sacarosa al 30% , embebieron y congelaron en una solución de 7.5% de gelatina en 15% sacarosa y se cortaron con criostato. Las secciones fueron desnaturalizadas con HCl 2N a 37° durante 30 minutos y lavadas con 0,1% TX-100 en PBS varias veces. Después reaccionaron con anti-BrdU (1:500, BD Bioscience).

Para los ensayos de **hibridación *in situ*** las secciones de criostato de 20-25 μ m se lavaron una vez con PBS (10 minutos) y se post-fijaron en 4% de PFA durante 10 minutos. Posteriormente se hizo un lavado de 1% TX-100 en PBS durante 30 minutos tras el cual se hicieron tres lavados más con PBS de 5 minutos. Las secciones fueron prehibridadas con tampón de hibridación (SSC 1x, 50% formamida, 10% dextran sulfato, 1mg/mL de tRNA, Denhardt 1x y H₂O) a 65°C durante 2 horas. Pasado ese tiempo se pasó a la fase de hibridación para la cual se usaron las siguientes sondas marcadas con digoxigenina (Roche): *Hes5*, *Lef1*, *Axin2*, *Dll1* (cedidas por Dr. Galceran); *Wnt2b*, *Wnt3a*, *Bmp4* (cedidas por Dr. McMahon); *Foxg1*, *Dlx2* (cedidas por Dr. Puellas); *Msx1*, *Lhx2* (cedidas por Dr. Monuki), y *Sfrp2*. Las sondas fueron desnaturalizadas a 80°C durante 5 minutos y posteriormente añadidas al tampón de hibridación. Las secciones se hibridaron durante una noche a 70°C.

En la fase de posthibridación las secciones fueron lavadas con SSC 5x pH 4.5 a 72°C y posteriormente lavadas con SSC 0,2X a 70°C durante una hora y con SSC 0,2x a temperatura ambiente durante 5 minutos. Finalmente, se pasó a hacer un lavado con tampón B1 (Tris 0,1 M pH7.5, NaCl 0,15 M y 0,1% Tween 20 en H₂O) a temperatura ambiente durante 5 minutos.

En la fase de detección se usó una solución de bloqueo de 10% FCS en tampón B1 y se incubaron las secciones durante una hora a temperatura ambiente. Después se añadió el anticuerpo anti-dig-AP (1:5000 Roche) en tampón B1 con 1% FCS y se dejó a temperatura ambiente durante una noche.

Finalmente, en la posthibridación las secciones se lavaron tres veces con tampón B1 y se equilibraron a través de 2 lavados con tampón B3 (Tris 0,1 M pH9.5, NaCl 0,1 M y MgCl₂ 50mM en H₂O) durante 5 minutos para ser posteriormente reveladas con tampón B4 (1,7 NBT y 1,7 BCIP por mL de tampón B3) tras lo cual se detuvo la reacción con 0,1% Tween20 en PBS. Todas las preparaciones fueron analizadas con un microscopio DM500 (Leica).

3.3. Detección de placas beta-amiloide

Para analizar la presencia de placas de beta-amiloide se usaron tres estrategias. En primer lugar las secciones se trataron 90% de ácido fórmico y posteriormente se utilizó el anticuerpo anti-A β que se une a los monómeros, oligómeros y estructuras fibrilares. La segunda estrategia fue a través del reactivo rojo Congo (Sigma) que se une a los depósitos de amiloide. Para ello, se tiñeron las secciones con una solución de 0.3% rojo Congo (solución A: 0,3g rojo Congo, 0,3 g cloruro sódico y 80% de etanol en un volumen final de 100ml) en 1% de hidróxido sódico (Solución B: 1g hidróxido sódico en 100 ml de agua destilada) durante 10 minutos (50 ml solución A y 0.5 ml de solución B). A continuación se aclararon con agua destilada y se introdujeron rápidamente (5-10 veces) en una solución alcalina de alcohol (1% de hidróxido sódico (Solución B) y 50% de etanol). Y finalmente se aclararon con agua del grifo. La tercera y última estrategia fue el uso del marcador tioflavina S (Sigma) (0.1% en 50% de etanol durante 5 minutos y dos lavados rápidos con 50% de etanol) que se une a láminas β presente en las agregaciones amiloides (placas difusas, nucleadas o neuríticas).

3.4. Western blot

Se extrajo el telencéfalo de los embriones *Sfrp1*^{-/-} y silvestres a la edad de E12.5, se añadió tampón de lisis RIPA (Tris HCl 50mM pH 7.4, NaCl 150mM, 1% TX-100, 0.5% deoxicholate, 0.1% SDS), PMSF e inhibidores de proteasas y se agitó vigorosamente. El tejido se disgregó usando homogenizadores, se pasó por jeringa (30 G) y se dejó en hielo durante 15 minutos. A continuación se centrifugó a 4°C y máxima velocidad durante 10 minutos. Los sobrenadantes y los pellets se almacenaron por separado, usando para las pruebas sólo el sobrenadante.

A continuación se cuantificó la cantidad de proteína en los sobrenadantes usando el Kit BCA (Thermo Scientific). Las muestras se usaron a una concentración de 2 μ g/ μ L en buffer de carga, éstas se ajustaron con buffer de lisis (Tris 0.5M pH 6.8, 10% SDS, Glicerol 87% β mercaptoetanol, azul bromofenol y agua) y se pusieron a 100°C durante 5 minutos para su desnaturalización tras los cuales se volvieron a poner en hielo. Posteriormente las muestras (20 μ L) se cargaron en un gel en gradiente 4-15% (Mini Proteant TGXTM Biorad). Las proteínas se separaron en el gel y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa usando para ello el transferidor iBLot2 (Life Technologies). Las membranas se bloquearon (5% leche en polvo en TBS con 0.1% Tween) durante 30 minutos y posteriormente se incubaron con el anticuerpo anti-N-cadherin C-terminal (1:500 Invitrogen), con el anticuerpo anti-NICD (1:1000 Cell signaling), con el anticuerpo anti-Notch1 (1:500 Santa Cruz) o con el anticuerpo anti- α -tubulina (1:10000 Sigma) como control de carga durante una noche a 4°C. Al día siguiente se hicieron tres lavados con TBST y se añadió un anticuerpo secundario (anti mouse-POD o anti

rabbit-POD 1:500.000) en el tampón de bloqueo durante 1 hora. Las proteínas marcadas se detectaron con el reactivo quimioluminiscente ECL (GE Healthcare). Los valores relativos de las proteínas en cuestión se determinaron mediante densitometría (Gs-800 Calibrated densitometer) relativizando la intensidad de banda a la intensidad de banda de la α -tubulina.

3.5. Electroporación *in útero* y detección de Top RFP

Para detectar la actividad transcripcional de la β -catenina, se electroporó un plásmido reportero constituido por siete repeticiones del sitio de unión de TCF junto a la proteína roja fluorescente (RFP) que se expresa bajo el promotor mínimo de la timidina quinasa (este plásmido fue cedido por el Dr. Pons). El complejo formado por β -catenina y TCF activa la transcripción de la RFP. El plásmido RFP fue co-electroporado junto a un plásmido que contiene la GFP bajo un promotor ubicuo en el palio medial de embriones E13.5 controles y nulos de *Sfrp1*. Las hembras preñadas fueron anestesiadas con Isoflurano (Abbot) para la extracción de los cuernos uterinos. Los embriones fueron inyectados en el ventrículo lateral mediante un capilar de cristal con 3 μ L de plásmido mezclado con el tinte Fast-green al 0.03% en 0.9% de salino (Top RFP 1 μ g/ μ L). A continuación se electroporaron los embriones mediante cinco pulsos de 38V a 50 milisegundos con un espaciado de 950 milisegundos (ECM830 BTX Harvard apparatus). Finalizado el proceso, el útero fue introducido en la cavidad abdominal de la madre, junto con suero salino estéril, y se suturó la piel para permitir que el embrión continuara con su desarrollo. Los embriones fueron analizados por inmunohistoquímica 48 horas después.

3.6. Estudios comportamentales

El registro automatizado de los parámetros comportamentales se hizo a través de los programas Versamax y Ethovisión. El investigador fue ciego tanto para la fase de expresimentación como para el análisis de los datos.

Test de reconocimiento de objetos

Este test está basado en la tendencia de los animales para investigar estímulos novedosos y sirve para valorar la memoria de reconocimiento. Se administró siguiendo un protocolo previamente establecido junto con pequeñas variaciones (Scullion et al., 2011). Brevemente, el test constó de tres ensayos, habituación, adquisición y test. En el **primer ensayo** los ratones fueron habituados al campo abierto vacío (36x56x30 cm) durante 20 minutos. 24 horas después los animales fueron sometidos al **ensayo de adquisición** y para ello se les introdujo en el campo abierto esta vez con dos objetos iguales (objeto A) colocados en dos esquinas. Los ratones pudieron explorar la arena y los objetos durante 10 minutos. A continuación, los animales volvieron a sus jaulas durante un intervalo de 3 horas antes de

comenzar el tercer ensayo. En el **ensayo test** los ratones volvieron a ser introducidos en el campo abierto durante 10 minutos, esta vez con el objeto familiar (objeto A) y un objeto nuevo (objeto B), contrabalanceando las posiciones. Se registró de forma manual el tiempo total de exploración con cada uno de los dos objetos, siendo necesario que la cabeza del animal se localizara al menos entre 0.5-1 cm del objeto explorado. La preferencia hacia el objeto nuevo refleja el uso de los procesos de memoria de reconocimiento en la exploración. El índice de reconocimiento se calculó y definió como la diferencia de tiempo explorando el objeto nuevo y el viejo sobre el tiempo total explorando ambos objetos $[(TB-TA)/(TA+TB)]$. Los objetos utilizados fueron dos bloques de plástico de distinta forma y color. La arena del campo abierto y los objetos se limpiaron con 70% de etanol.

Laberinto acuático de Morris

Este test valora memoria espacial y específicamente la función hipocampal (Morris, 1984). Consistió en una piscina circular de 100 cm de diámetro y con paredes de 40 cm. La piscina presentó pistas visuales fijadas en las paredes y se dividió en cuatro cuadrantes. En uno de ellos se colocó una plataforma de escape de 8 x 8 cm donde el animal podía subirse para sentirse a salvo. La plataforma estaba sumergida 1 cm sobre el agua y era transparente. La temperatura del agua fue de $22^{\circ}\text{C} \pm 1$. Los animales fueron secados y mantenidos en calor entre los ensayos. Los datos fueron registrados de forma automatizada.

En el test se diferenciaron tres tipos de ensayos. En el ensayo de **habitación** los ratones fueron sumergidos en la piscina sin la plataforma de escape durante 60 segundos. En esta fase se estudió el rendimiento de nado y la preferencia por cuadrante. 24 horas después se hicieron los ensayos de **adquisición**, que se llevaron a cabo durante 4 días y 4 ensayos por día (total 16 ensayos) dejando un intervalo entre los ensayos de 30 minutos. Los animales comenzaron aleatoriamente por los cuatro puntos cardinales de la piscina. Los parámetros registrados fueron la distancia de desplazamiento, la velocidad y el tiempo usado para encontrar la plataforma (latencia de escape). Si el ratón no encontraba la plataforma en 60 s. era guiado a la misma y mantenido sobre ella 20 segundos. Finalmente, el **ensayo prueba** se realizó 24 horas después, los animales fueron sumergidos en el centro de la piscina pero esta vez sin plataforma durante 60 segundos. En esta fase se analizó el tiempo que el animal nadó en el cuadrante la plataforma escondida.

Exploración de campo abierto

La actividad locomotora se analizó a través de un campo abierto dotado de un sistema de monitorización de la actividad (actímetro). Este sistema (25x25x25 cm) contaba con fotocélulas que detectaban la actividad horizontal y vertical. Antes de llevar a cabo el test los animales fueron habituados a la sala durante 60 minutos, tras los cuales fueron introducidos cuidadosamente en el actímetro durante 5 minutos. En el tiempo de prueba se registraron

varios parámetros de actividad locomotora de forma automática (actividad horizontal, actividad vertical, levantamientos y estereotipias). Tras el test los animales regresaron a sus jaulas y los actímetros fueron limpiados con 70% etanol.

3.7. Análisis estadísticos

Para analizar la normalidad de la distribución se usó el test Kolmogorov-Smirnov. Para estudiar la significatividad estadística se usó la distribución t de Student o ANOVA de una vía. En este último caso cuando el valor F era significativo se pasó a hacer los análisis *post hoc* usando para ello la prueba de Tukey. Todos los valores de las gráficas se representan como medias \pm error estándar de la media (s.e.m). Para todos los cálculos se usó el paquete estadístico SPSS versión 17.0 usando un nivel de significatividad de $p \leq 0.05$. Los resultados se representaron gráficamente con el programa Microsoft Excel 2010.

RESULTADOS

1. RESULTADOS

4.1. La presencia de *Sfrp1* es necesaria para el desarrollo correcto de la corteza cerebral

4.1.1. *Sfrp1* se expresa abundantemente en el neuroepitelio cortical durante el desarrollo embrionario.

Sfrp1 se expresa en el telencéfalo de ratón durante el desarrollo (Augustine et al., 2001; Kim et al., 2001). Sin embargo, hasta el momento no se ha estudiado si ejerce alguna función en el desarrollo de la corteza cerebral de mamíferos. Para tal fin, extendimos estudios previos que analizaban la expresión del ARNm de *Sfrp1* durante el desarrollo del telencéfalo de ratón (Kim et al., 2001) con análisis inmunohistoquímicos ya que *Sfrp1* es una proteína secretable (Fig.6).

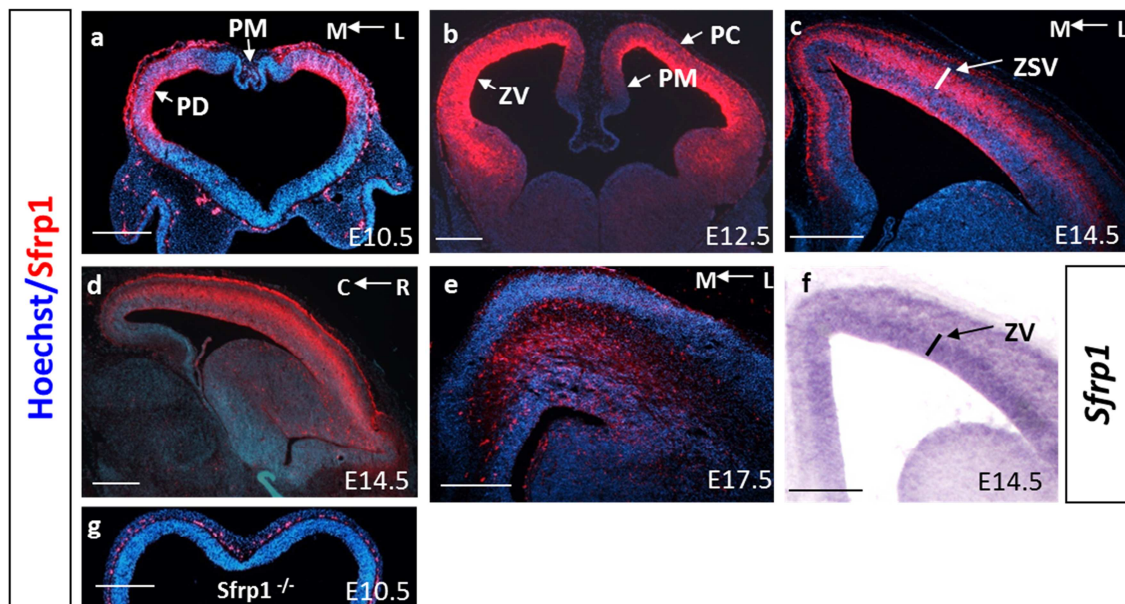


Figura 6. *Sfrp1* se localiza en el neuroepitelio cortical durante el desarrollo embrionario. Secciones de criostato de cerebro inmunoteñidas con el anticuerpo anti-*Sfrp1* (a-e, g) o analizadas mediante hibridación *in situ* con una sonda de ARNm específica para *Sfrp1* (f), en estadios 10.5 (a, g), E12.5 (b), E14.5 (c, d, f) y E17.5 (e) procedentes de embriones silvestres (a-f) y de embriones *Sfrp1*^{-/-} (g). La expresión de *Sfrp1* presenta un gradiente dorsal^{alto} ventral^{bajo} en las vesículas telencefálicas en E10.5 (a) y E12.5 (b), está ausente en el palio medial en E10.5 (a) y muy reducida en E12.5 (b). En E14.5 la proteína se localiza mayoritariamente en la zona subventricular (ZSV) (c) y presenta un gradiente antero-posterior (d). En E17.5 los niveles de expresión de *Sfrp1* disminuyen considerablemente y se localiza en células dispersas por toda la corteza (e). En E14.5 el ARNm se expresa en la zona ventricular (f). Las secciones de los embriones *Sfrp1*^{-/-} no presentan inmunotinción (g), confirmando la especificidad del anticuerpo. PD palio dorsal; PM palio medial; ZV zona ventricular; PC placa cortical; M medial; L lateral; C caudal; R rostral. Las barras de escala son 400 μm.

En este sentido, observamos que al comienzo de la neurogénesis, de E10.5 a E12.5 (Fig.6a, b), *Sfrp1* se expresaba en gradiente, siendo alta su expresión en el palio dorsal y lateral y baja en el palio medial y subpalio. La proteína se localizaba en las células progenitoras de la ZV solapando con la expresión de su ARNm (Kim et al., 2001). Sin embargo, aunque el ARNm de *Sfrp1* en embriones E14.5 se detectaba en los progenitores de la ZV (Fig.6f), la proteína se localizaba tanto en la ZV como en la ZSV (Fig.6c, d), lugar donde se sitúan las CGR y las CPI, respectivamente. Estos datos indican que la proteína *Sfrp1* difunde desde su fuente de síntesis

en la ZV hacia la ZSV. Además, en este estadio la expresión de *Sfrp1* presenta un gradiente antero^{alto} posterior^{bajo} (Fig.6d). A partir de E17.5 la expresión de *Sfrp1* estaba más distribuida localizándose en células dispersas alrededor de los ventrículos laterales y en el plexo coroideo (Fig.6e). Como control de especificidad utilizamos embriones nulos para *Sfrp1* donde no se detectó señal (Fig.6g).

Por tanto, la abundante expresión temprana de *Sfrp1* en regiones proliferativas del telencéfalo sugiere que podría tener una función en el comienzo de la neurogénesis.

4.1.2. *Sfrp1* contribuye al desarrollo correcto hipocampal regulando positivamente la activación de la vía Wnt/ β -catenina

Durante el desarrollo, *Sfrp1* junto con *Sfrp2* participa en el establecimiento del límite entre la retina neural y la retina periférica regulando positivamente la vía de Wnt/ β -catenina (Esteve et al., 2011b). Por ello, decidimos estudiar si en el palio medial, una región especificada por la vía Wnt/ β -catenina, *Sfrp1* tenía el mismo efecto.

Para ello comenzamos analizando la expresión de *Foxg1* en embriones E12.5, un FT de tipo hélice requerido para especificar el palio dorsal. Este FT se expresa en gradiente desde el palio dorsal hasta el medial y está ausente en *hem* cortical (Muzio and Mallamaci, 2005). En embriones nulos de *Sfrp1* la expresión de *Foxg1* estaba expandida hacia zonas más mediales invadiendo el territorio del *hem* cortical (Fig.7b). Lo mismo ocurrió con el gen LIM homeobox *Lhx2* (Fig.7f) que se expresa en células precursoras corticales pero no en la línea media adyacente (*hem* cortical y plexo coroideo) (Mangale et al., 2008). Además, el primordio hipocampal marcado por la expresión de *lef1*^{alta} (Galceran et al., 2000) y *Foxg1*^{baja} (Muzio and Mallamaci, 2005) estaba reducido en los embriones *Sfrp1*^{-/-} (Fig.7d).

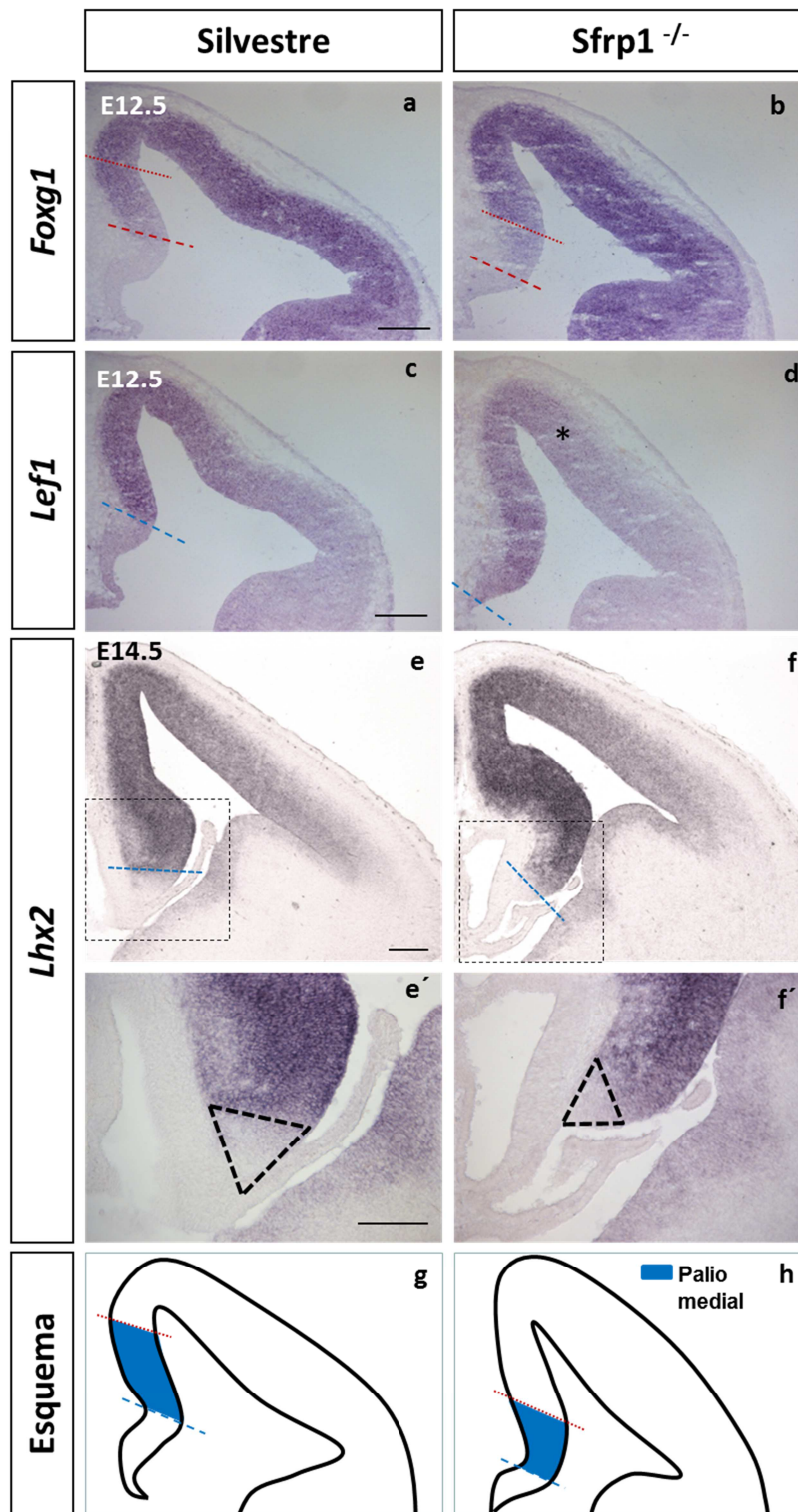


Figura 7. En embriones deficientes para *Sfrp1* el palio medial está reducido. Secciones coronales de cerebro procedentes de embriones silvestres (a, c, e) y *Sfrp1*^{-/-} (b, d, f) en E12.5 (a-d) y E14.5 (e-f) fueron hibridadas con una sonda específica para *Foxg1* (a-b), *Lef1* (c-d) y *Lhx2* (e-f). En los embriones nulos de *Sfrp1* se observa una expansión en la expresión de estos marcadores hacia zonas más mediales (a-d) invadiendo el territorio del hem, lo que induce que esta región esté más reducida, (e-f). e', f' magnificaciones. Representación esquemática de los efectos (g-h) donde se muestra el palio medial sin *hem* cortical (azul). *Nótese cómo la expresión de *Lef1*, una diana directa de la vía Wnt/ β -catenina, está disminuida en el palio dorsal de los embriones *Sfrp1*^{-/-}. Las barras de escala son 200 μ m.

Asimismo, analizamos en los embriones E12.5 el territorio del *hem* cortical marcado por la expresión de *Wnt2b*, *Wnt3a* y *Wnt5a* (Grove et al., 1998) y ausencia de *Foxg1* (Furuta et al., 1997) y observamos una reducción en la expresión de estos marcadores en los embriones

Sfrp1^{-/-} (Fig.8b, d, f, h) comparados con los controles (Fig.8a, c, e, g). Estos datos sugieren que la inactivación genética de *Sfrp1* produce una expansión del primordio neocortical a expensas del primordio hipocampal y del *hem* cortical.

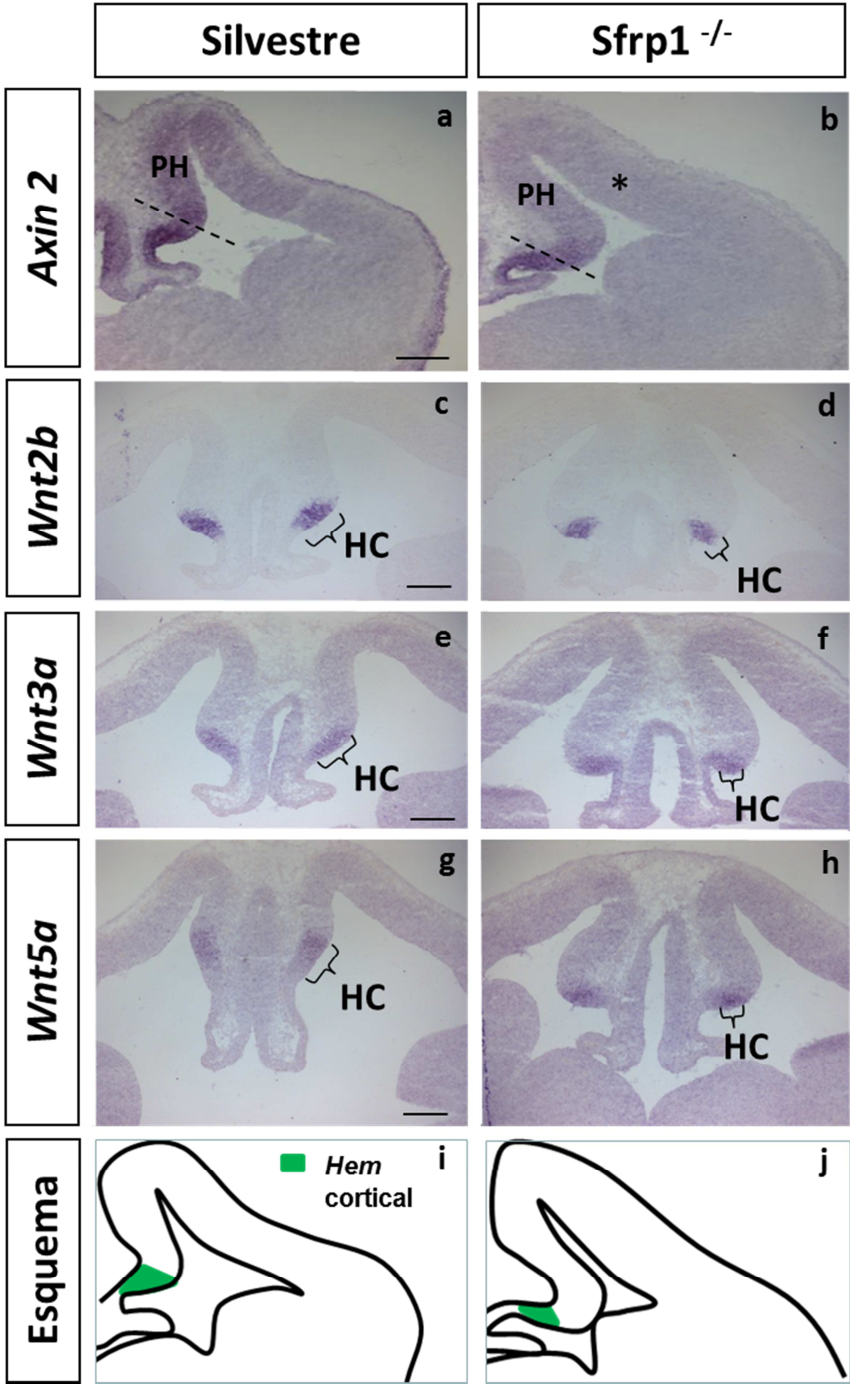


Figura 8. El *hem* cortical está reducido en embriones *Sfrp1*^{-/-}. Secciones coronales de criostato de cerebros E12.5 silvestres (a, c, e, g) y *Sfrp1*^{-/-} (b, d, f, h) fueron hibridadas con una sonda específica para *Axina2* (a-b), *Wnt2b* (c-d), *Wnt3a* (e-f), y *Wnt5a* (g-h). Nótese como la expresión de *Axina2* está muy reducida en el primordio hipocampal (PH) y en el palio dorsal* de los animales mutantes (a-b). Además, el *hem* cortical (HC) marcado por la expresión de *Wnt2b* (c-d), *Wnt3a* (e-f) y *Wnt5a* (g-h) es de menor tamaño en los embriones mutantes frente a los silvestres. Representación esquemática de los efectos (i-j) donde se muestra el *hem* cortical (verde). Las barras de escala son 200 µm.

Como el primordio del hipocampo se especifica gracias a la activación de la vía de señalización Wnt/ β -catenina, examinamos los niveles de actividad de esta vía en los embriones nulos de *Sfrp1* analizando la expresión del gen diana directo *Axina2*. El ARNm de *Axina2* se encontraba disminuido en todo el neuroepitelio cortical, incluido el primordio hipocampal, de los embriones *Sfrp1*^{-/-} (Fig.8b). Además, estudiamos el estado de activación de la vía canónica mediante ensayos de co-electroporación *in útero* de los plásmidos Top RFP, un reportero de la

actividad transcripcional β -catenina, y GFP en embriones E13.5. Los ratones *Sfrp1*^{-/-} electroporados en E13.5 en la región medial del telencéfalo y analizados 48 horas después mostraron, a través de ensayos de inmunohistoquímica con los anticuerpos anti-RFP y anti-GFP, una menor señalización Wnt/ β -catenina respecto a los controles (Fig.9e-f), siendo el porcentaje de células que coexpresan GFP y RFP significativamente menor en los embriones *Sfrp1*^{-/-} frente a los controles (67% \pm 4.3 frente a 91% \pm 2.7; $p=0.041$)

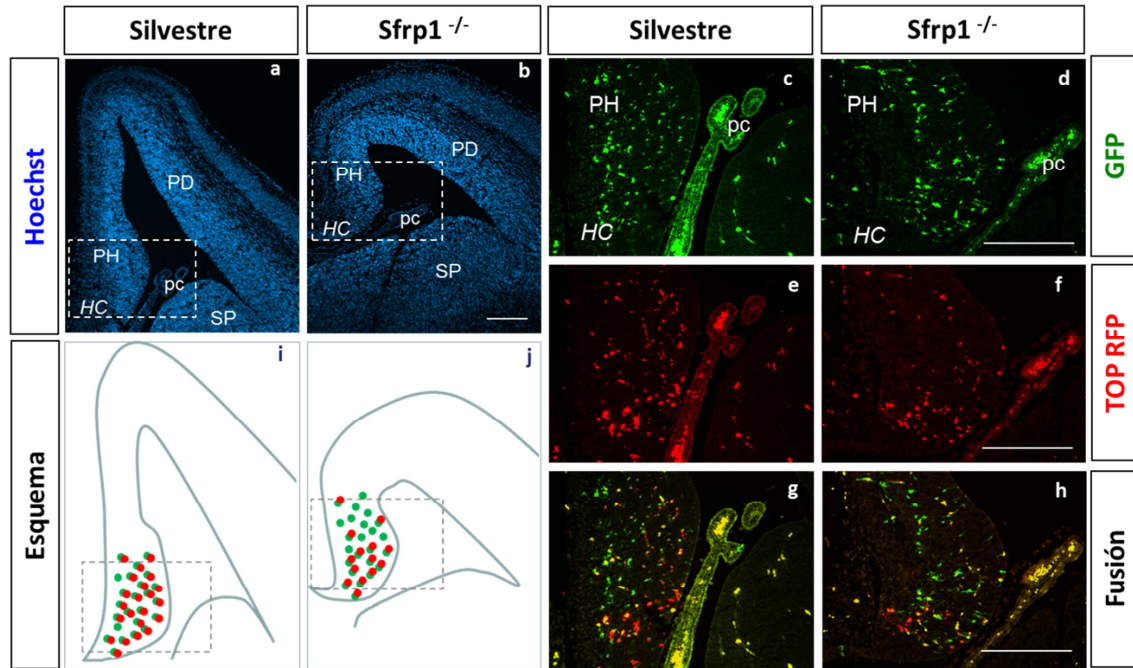


Figura 9. *Sfrp1* regula la señalización Wnt/ β -catenina en el primordio hipocampal. Co-electroporación *in utero* del plásmido Top RFP (un indicador del estado de activación de la vía β -catenina) y de un plásmido GFP en E13.5 en el telencéfalo de embriones silvestres (a, c, e, g) y mutantes de *Sfrp1* (b, d, f, h) y análisis 48 horas después. Las secciones coronales del cerebro de ambos grupos de embriones presentan una electroporación similar monitorizada con el marcaje de GFP (verde) (c-d). Sin embargo, en los embriones *Sfrp1*^{-/-} se observa que en el primordio hipocampal la señalización de la vía β -catenina (rojo) está disminuida (e-f) comparada con los embriones silvestres, restringiéndose al *hem* cortical. Nótese como en el plexo coroideo tanto los ratones silvestres como los mutantes presentan una activación de Wnt similar. Núcleos marcados con Hoechst (a-b). Representación esquemática de los efectos (i-j) donde se observan células que expresan GFP (verde) y el plásmido Top RFP (rojo). PH primordio hipocampal, HC *Hem* cortical, pc plexo corioideo, PD palio dorsal, SP subpalio. Las barras de escala son 200 μ m.

El *hem* cortical también expresa *Bmp4* y *Bmp7* responsables de inducir la formación del plexo coroideo (Furata et al., 1997), por ello analizamos la expresión de *Bmp4* así como una diana directa de la vía BMP, *Msx1*. No detectamos diferencias en los niveles de expresión ni de *Bmp4* ni de *Msx1* entre los embriones controles y los *Sfrp1*^{-/-} (Fig.10), indicando que la deficiencia de *Sfrp1* provoca una reducción del primordio hipocampal sin que esté afectado el plexo coroideo. Además, la expansión del primordio neocortical se limitó a la región medial, sin afectar a la región ventro-lateral como se observa por la expresión de *Sfrp2* (límite palio-subpalio conocido como *antihem* (Subramanian et al., 2009)), y *Dlx2* (subpalio) (Fig. 11). Por tanto *Sfrp1* regula la vía Wnt/ β -catenina y como consecuencia el establecimiento de territorio del primordio hipocampal en el neuroepitelio cortical.

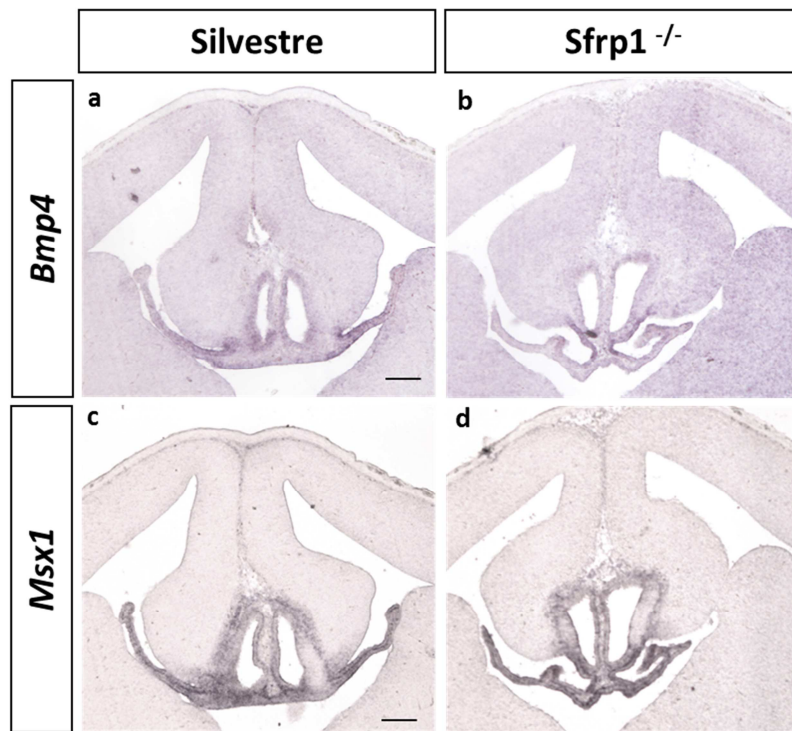


Figura 10. La formación del plexo coroideo no se encuentra alterada en los embriones *Sfrp1*^{-/-}. Secciones coronales de criostato de embriones E14.5 silvestres (a, c) y *Sfrp1*^{-/-} (b, d) hibridadas con una sonda específica para *Bmp4* (a-b) y su diana directa *Msx1* (c-d). Nótese como no se observan diferencias entre ambos grupos de embriones en la expresión del ARNm de *Bmp4* ni *Msx1* en el plexo coroideo. Las barras de escala son 200 μ m.

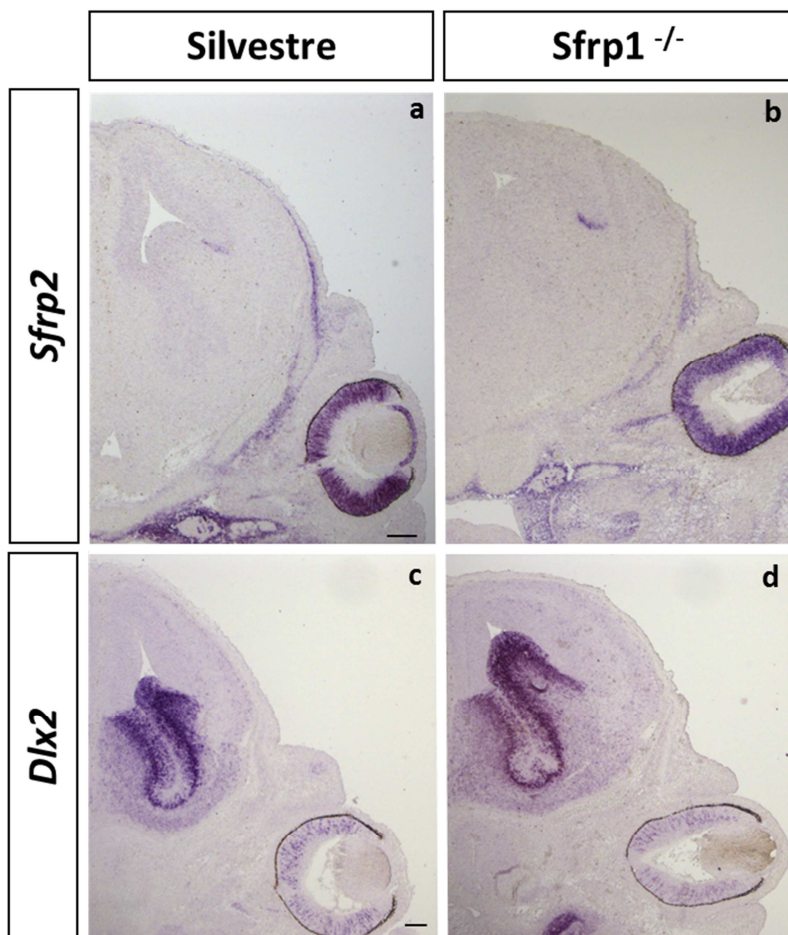


Figura 11. El límite palio-subpalio no se encuentra desplazado en los embriones *Sfrp1*^{-/-}. Secciones coronales de criostato de embriones E14.5 silvestres (a, c) y *Sfrp1*^{-/-} (b, d) hibridadas con una sonda específica para *Sfrp2* (a-b), un marcador del límite palio-subpalio, y *Dlx2* (c-d), un marcador de subpalio. Nótese como el límite palio-subpalio es similar en ambos los dos grupos de embriones. Las barras de escala son 200 μ m.

Estos datos sugieren que *Sfrp1* es requerido para la expansión de la activación de la vía Wnt/ β -catenina en el palio medial de forma similar a lo observado en la retina periférica (Esteve et al., 2011b). La deficiencia de *Sfrp1* induce un desplazamiento del primordio

neocortical a expensas del primordio hipocampal. Dichos defectos no son compensados con el paso del tiempo observándose alteraciones postnatales en el hipocampo y la corteza cingulada (ver apartado 4.1.4).

4.1.3. La deficiencia de *Sfrp1* provoca alteraciones en la neurogénesis embrionaria cortical a través de la vía Notch y Wnt/ β -catenina

La expresión abundante de *Sfrp1* en las células progenitoras corticales así como el aumento de actividad de la señalización de Notch en el telencéfalo de embriones mutantes *Sfrp1*^{-/-}; *Sfrp2*^{-/-} durante la neurogénesis temprana (Esteve et al., 2011a) sugiere que *Sfrp1* podría contribuir en los procesos de proliferación temprana cortical.

Para estudiar la proliferación comenzamos marcando las células en fase S del ciclo celular a través de la inyección de BrdU en madres gestantes de embriones E11.5 y E12.5. Tras un pulso de una hora, extrajimos los embriones y analizamos por inmunohistoquímica las secciones corticales de embriones controles y *Sfrp1*^{-/-}. En los embriones deficientes en *Sfrp1* observamos un incremento significativo en el número de células BrdU positivas comparado con los controles tanto en E11.5 y en E12.5 (Fig.12a-d).

Para identificar qué tipo de células progenitoras (CGR o CPI) presentaban cambios en proliferación por la deficiencia de *Sfrp1* comenzamos haciendo ensayos inmunohistoquímicos con el anticuerpo que reconoce la forma fosforilada de la fosfohistona H3 (PH3) que marca las células en fase G2/M. Las secciones de embriones mutantes presentaron en la zona abventricular (futura ZSV) del palio dorsal, lugar donde se dividen las CPI, un número de células en mitosis significativamente mayor en E12.5, sin mostrar cambios estadísticamente significativos en la ZV, donde se dividen las CGR (Fig.12g). Sin embargo, dos días después (en E14.5) el número de células PH3 positivas en la ZSV fue similar en los embriones *Sfrp1*^{-/-} comparado con los controles (Fig.12h-i). En E16.5 estas diferencias se invirtieron y así los embriones nulos de *Sfrp1* mostraron un número significativamente menor de células en mitosis en la ZSV respecto a los controles (Fig.12j-k). Estos datos indican un importante efecto de *Sfrp1* en la proliferación de las CPI presentes en la ZSV en los estadios analizados.

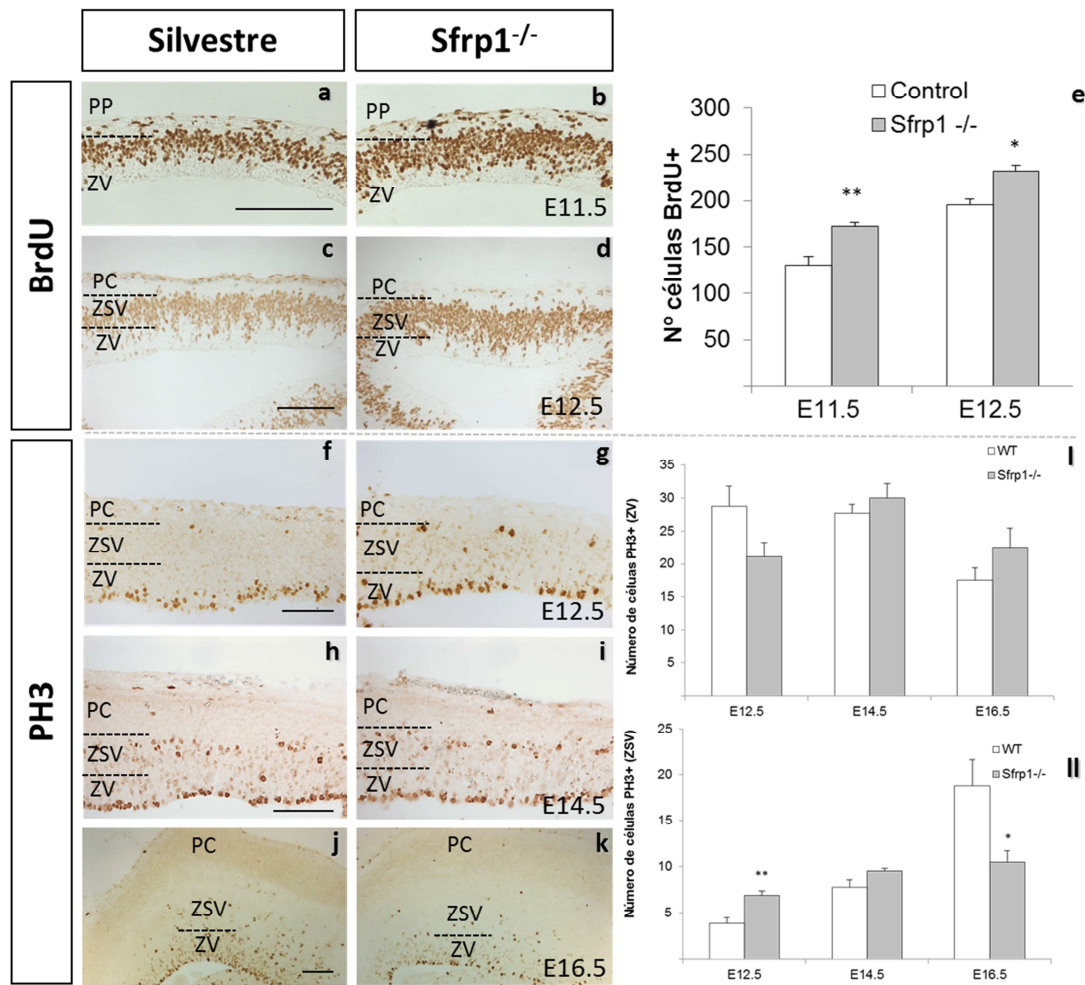


Figura 12. La tasa de proliferación está alterada en los progenitores neurales del palio dorsal en los embriones deficientes para *Sfrp1*. Secciones coroneales de criostato de embriones silvestres (a, c, f, h, j) y de embriones *Sfrp1*^{-/-} (b, d, g, i, k) inmunoteñidas con el anticuerpo contra BrdU, un marcador de la fase S en E11.5 (a-b) y E12.5 (c-d). Las madres fueron inyectadas con BrdU y una hora después fueron sacrificadas. Los embriones mutantes muestran un incremento significativo en el número de células BrdU positivas (e). Secciones de criostato coroneales de telencéfalo en E12.5 (f-g), E14.5 (h-i) y E16.5 (j-k) inmunoteñidos con el anticuerpo anti-fosfohistona H3 (PH3), un marcador de ciclo celular específico de la fase M, que también marca la fase G2 (intensidad más leve). Cuantificación del número de células PH3+ en la ZV (l) y ZSV (m). En la ZSV de los embriones *Sfrp1*^{-/-} se observa un incremento en el número de células PH3 positivas en etapas tempranas del desarrollo, reduciéndose posteriormente. Los valores de las gráficas se representan como media \pm el error estándar de media. Los análisis se realizaron usando la distribución t de Student; $n \geq 3$. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ frente a los embriones silvestres. PP Preplaca, ZV zona ventricular, PC placa cortical, ZSV zona subventricular (nota: en los embriones E12.5 la ZSV corresponde a la zona abventricular). Las barras de escala son 200 μ m.

Como el anticuerpo PH3 marca el número de células que se dividen en un momento concreto del ciclo celular, decidimos analizar el número total de progenitores mediante ensayos de inmunohistoquímica utilizando marcadores que se expresan exclusivamente en los distintos tipos de células progenitoras. Inmunoteñimos secciones de embriones E12.5 controles y nulos de *Sfrp1* con el anticuerpo anti-Pax6, que marca CGR de la ZV y con el anticuerpo anti-Tbr2 expresado exclusivamente por las CPI de la ZSV (Molyneaux et al., 2007). Tanto el número de células Pax6 positivas como de células Tbr2 positivas fue significativamente mayor en el palio dorsal en los embriones nulos de *Sfrp1* comparado con los controles (Fig.13).

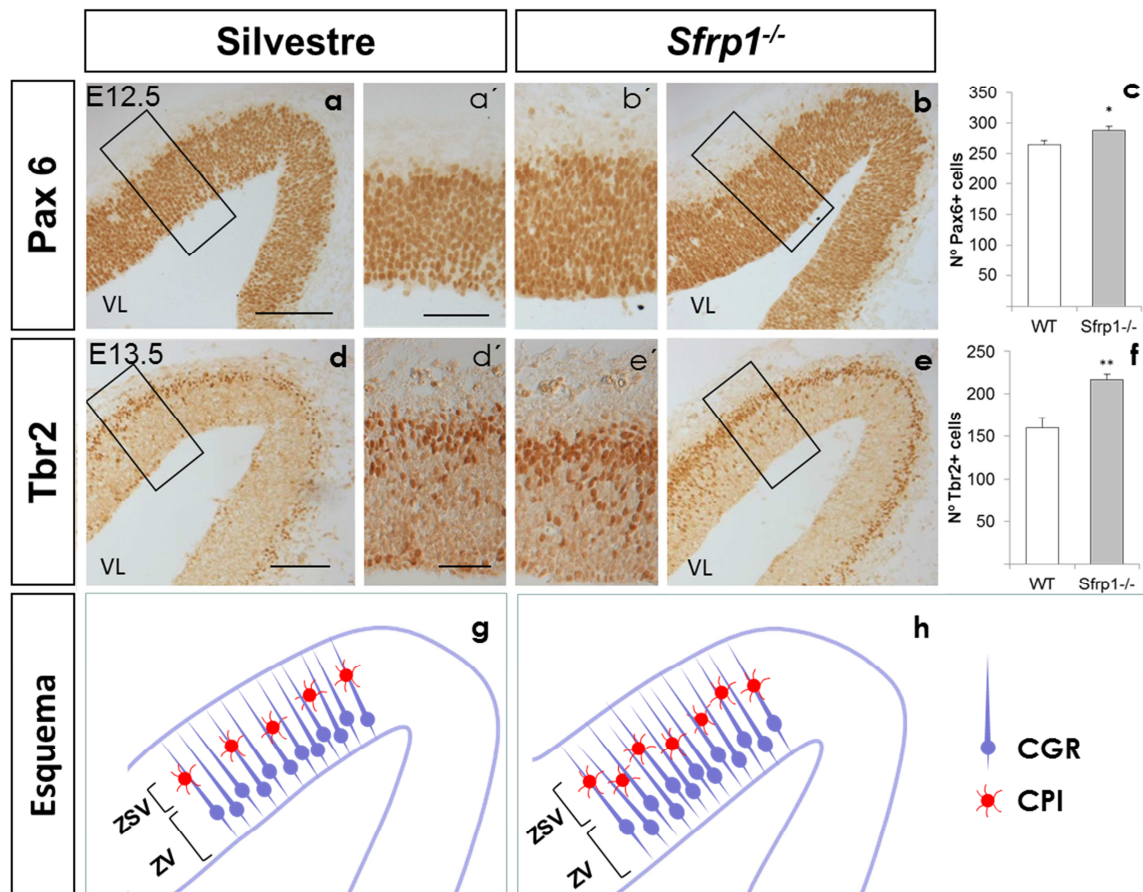


Figura 13. La inactivación genética de *Sfrp1* altera el número de progenitores en el palio dorsal. Secciones coronales de criostato de embriones silvestres (a, d) y *Sfrp1*^{-/-} (b, e), inmunoteñidas con el anticuerpo anti-Pax6 (marcador de CGR) en E12.5 (a, b), y con el anticuerpo anti-Tbr2 (marcador de CPI) en E13.5 (d, e) y su cuantificación (c, f). La pérdida de *Sfrp1* se asocia a un incremento en el número de progenitores CGR y CPI. a', b', d', e' magnificaciones. La cuantificación se representan como la media del número de células positivas marcadas +/- el error estándar de media. Los análisis se realizaron usando la distribución t de Student; n≥3. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ frente a los embriones silvestres. Representación esquemática de los efectos (g): CGR (verde) CPI (rojo). CGR células de glía radial, CPI células progenitoras intermedias, VL ventrículo lateral, ZV zona ventricular, ZSV zona subventricular. Las barras de escala son 200 μm (a,b,d,e) y 100 μm (a',b',d',e').

Como la inactivación genética de *Sfrp1* incrementa el número de progenitores neurales, nos planteamos si este incremento estaba ligado a alteraciones en la diferenciación neuronal. Para ello, inmunoteñimos las secciones de los embriones controles y mutantes en estadio E11.5 con el anticuerpo anti-Tbr1, un marcador general de las primeras neuronas glutamatérgicas en generarse y en estadio E12.5 con anti-Tuj1, un marcador de neuronas en diferenciación. El número de células Tbr1 positivas fue estadísticamente mayor ($p \leq 0.001$) en embriones *Sfrp1*^{-/-} (108.0 ± 4.24) comparado con los controles (67.8 ± 4.6) (Fig.14a-b). Los mismo ocurrió con el anticuerpo Tuj1 (Fig.14c-d). Por tanto, la deficiencia de *Sfrp1* fuerza la generación de progenitores neurales y su diferenciación en neuronas.

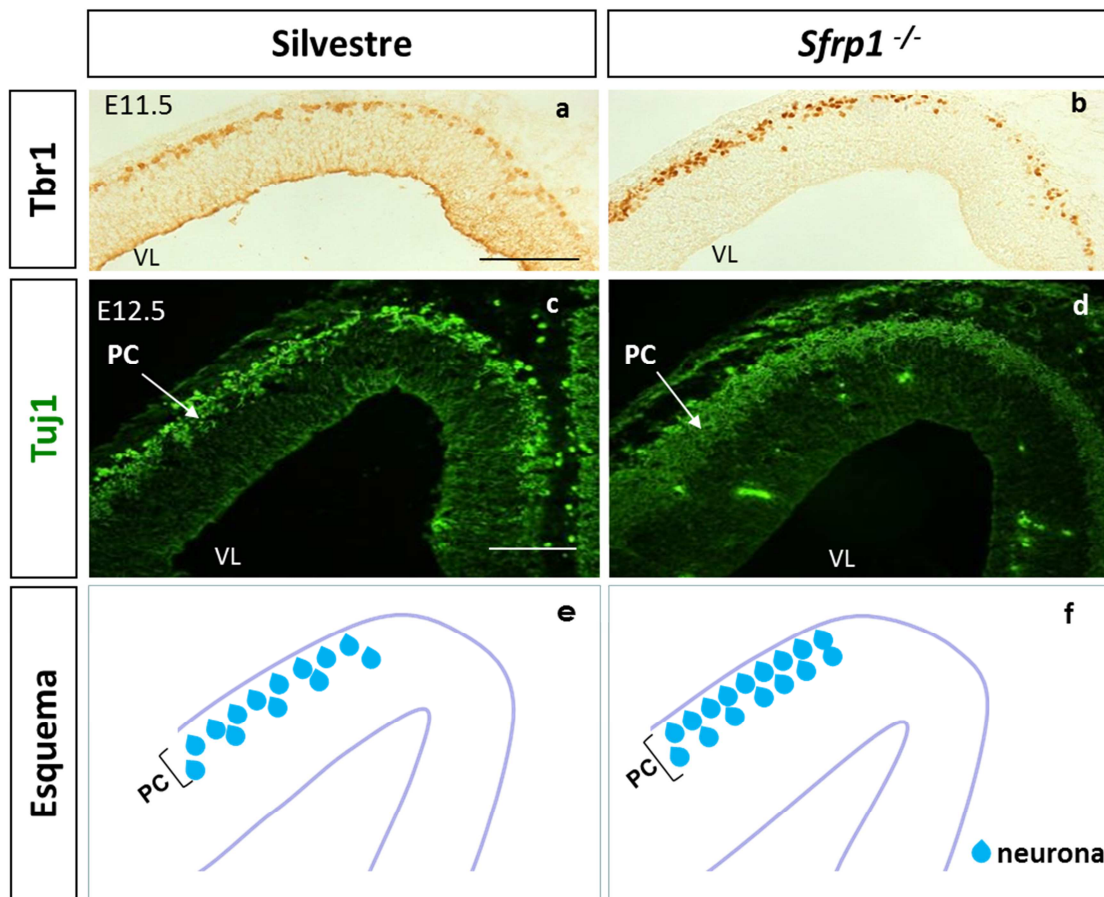


Figura 14. La inactivación genética de *Sfrp1* altera la neurogénesis en el palio dorsal. Secciones coronales de criostato de telencéfalo de embriones silvestres (a, c) y *Sfrp1*^{-/-} (b, d) inmunoteñidos con anti-Tbr1, un marcador de las primeras neuronas en nacer, en E11.5 (a-b) y anti-Tuj1, un marcador general de neuronas diferenciadas, en E12.5 (c-d). En los embriones *Sfrp1*^{-/-} se observa un incremento en el número de células Tbr1 y Tuj1 positivas en la placa cortical. Nótese como la placa cortical (PC) presenta un mayor grosor en los embriones *Sfrp1*^{-/-} frente a los embriones silvestres. Representación esquemática de los efectos (e-f) donde se muestran neuronas diferenciadas (azul). PC placa cortical, VL ventrículo lateral. Las barras de escala son 200 μ m.

Dado que *Sfrp1* y *Sfrp2* regulan la vía de Notch y la vía Wnt/ β -catenina durante el desarrollo del ojo (Esteve et al., 2011a; Esteve et al., 2011b) estudiamos el estado de activación de estas dos vías en el palio dorsal. La vía de Notch mantiene a las CGR en un estado proliferativo y por tanto es relevante en el desarrollo neocortical (Mizutani et al., 2007). Estudios por hibridación *in situ* en secciones de criostato revelaron que la expresión de *Hes5*, uno de los genes dianas directos de la vía Notch, en E11.5 se incrementó en los embriones *Sfrp1*^{-/-} en la ZV cortical comparado con los controles, tanto en el palio dorsal como en el medial (Fig.15a-b). Posteriormente, en E14.5 la expresión de *Hes5* disminuyó en los embriones *Sfrp1*^{-/-} comparado con los controles (Fig.15c-d). El aumento de la activación de la vía en estadios tempranos también se observó por ensayos de *Western blot*, a partir de muestras de telencéfalos en E12.5, donde se observaron incrementos en NICD en los ratones nulos de *Sfrp1* frente a los ratones silvestres (162 \pm 20 frente a 100 \pm 0; $p=0.04$), sin que hubiera cambios en el receptor Notch1 total (Fig.15g), lo que indica un mayor procesamiento del receptor Notch y por lo tanto una mayor actividad de ADAM10. Junto a todo ello, el número de células que

expresan el ligando Dll1 estaba incrementado en los embriones *Sfrp1*^{-/-} frente a los controles en E11.5 (Fig. 15e-f). Estos datos sugieren que *Sfrp1* regula negativamente y de forma transitoria la vía de Notch pudiendo ser este mecanismo responsable de la alta tasa de proliferación en las CGR temprana observada en los embriones *Sfrp1*^{-/-}.

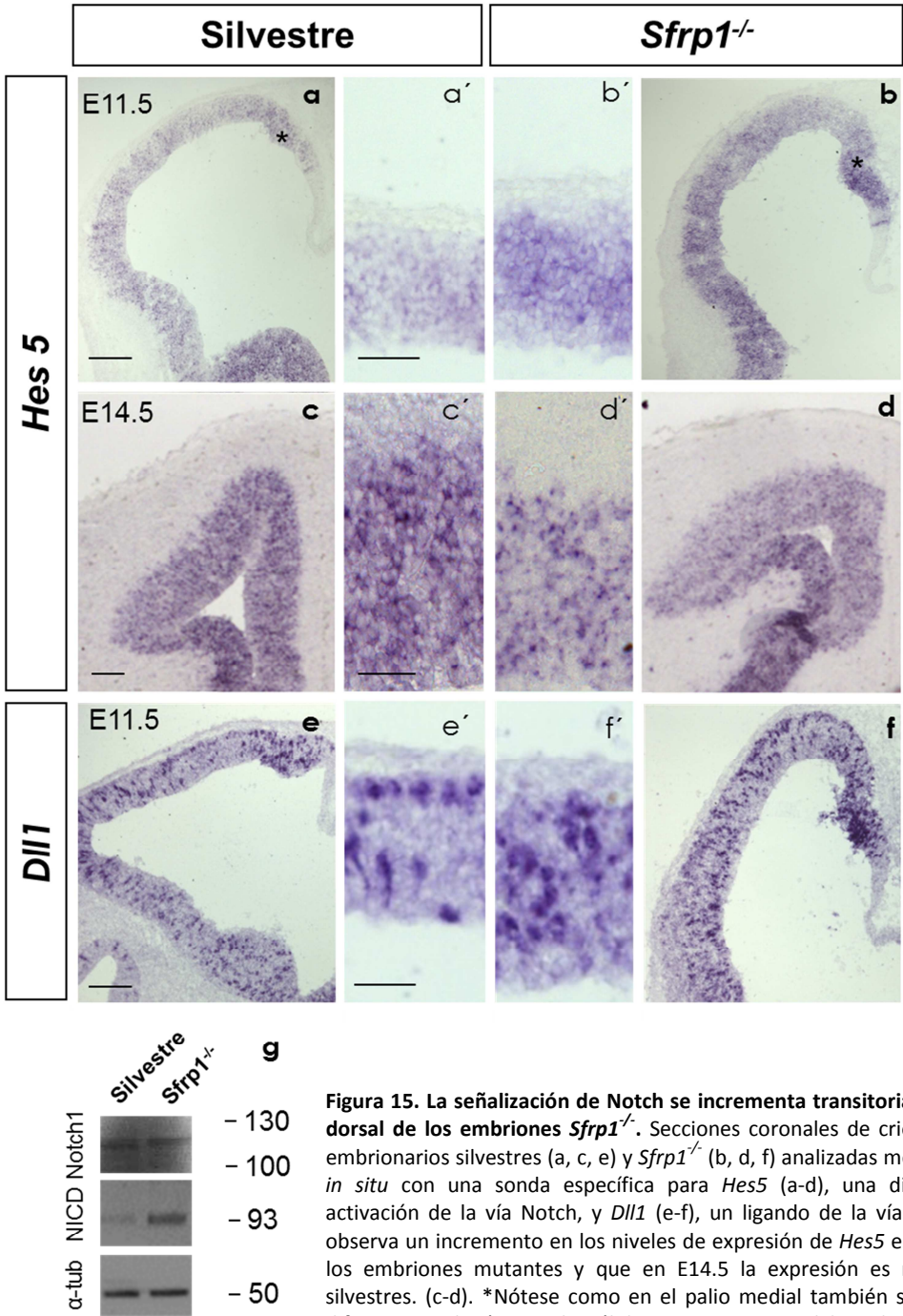


Figura 15. La señalización de Notch se incrementa transitoriamente en el palio dorsal de los embriones *Sfrp1*^{-/-}. Secciones coronales de criostato de cerebros embrionarios silvestres (a, c, e) y *Sfrp1*^{-/-} (b, d, f) analizadas mediante hibridación *in situ* con una sonda específica para *Hes5* (a-d), una diana directa de la activación de la vía Notch, y *Dll1* (e-f), un ligando de la vía. En E11.5 (a-b) se observa un incremento en los niveles de expresión de *Hes5* en el palio dorsal en los embriones mutantes y que en E14.5 la expresión es menor que en los silvestres. (c-d). *Nótese como en el palio medial también se mantienen estas diferencias. El número de células que expresan el ligando *Dll1* también está incrementado en secciones de embriones mutantes en E11.5 (e-f). a'- f' magnificaciones. Western blot de lisados de telencéfalo procedente de embriones silvestres y *Sfrp1*^{-/-} en E12.5 utilizando un anticuerpos que reconocen exclusivamente el receptor de Notch1, el fragmento de Notch1 intracelular y α-tubulina como control de carga (g). NICD está aumentado significativamente en los embriones *Sfrp1*^{-/-} respecto a los embriones silvestres. Las barras de escala son 200 μm (a-f) y 100 μm (a'-f').

Además en los embriones nulos de *Sfrp1* la actividad de la vía β -catenina en el palio dorsal estaba disminuida, como se observó a partir de la expresión de la *axina 2* (Fig.8a-b). Estudios previos han mostrado que durante el establecimiento de patrón de la retina central y periférica, *Sfrp1* y *Sfrp2* modulan positivamente la vía Wnt/ β -catenina (Esteve et al., 2011b) y este mismo efecto también se detecta en el palio dorsal, donde se expresa exclusivamente *Sfrp1*.

Como *Sfrp1* regula la actividad proteolítica de ADAM10 y uno de sus sustratos es N-cadherina, analizamos por ensayos de *western blot* los niveles de expresión y el procesamiento de N-cadherina en telencéfalos embrionarios nulos para *Sfrp1* y controles ya que esta proteína regula de forma independiente a Wnt la vía β -catenina. Sin embargo, los resultados no fueron concluyentes, quizás debido a pequeñas variaciones en el estadio embrionario de los animales (datos no mostrados).

4.1.4. Los defectos producidos durante el desarrollo embrionario por la deficiencia de *Sfrp1* causan alteraciones histológicas postnatales

Las alteraciones tempranas del palio que presentaban los embriones nulos para *Sfrp1* no se compensaron postnatalmente. Los cerebros adultos de los mutantes de *Sfrp1*^{-/-} tenían menor tamaño sin que se vieran afectadas, por lo menos a nivel macroscópico, otras estructuras como el cerebelo, el tronco del encéfalo o el bulbo olfatorio tanto en ratones P7 (Fig.17a-b) como en ratones adultos (Fig.18a-b). El hipocampo era más pequeño en los ratones postnatales nulos para *Sfrp1* como se puso de manifiesto por los marcadores más generales del hipocampo EphA7, Tbr1 y NeuN o por los marcadores restringidos a las células granulares del giro dentado Prox1 y reelina (Fig.16). Así, aunque la regionalización de los distintos territorios hipocampales no se encontraba alterada, su tamaño disminuyó considerablemente, incrementándose el de la corteza cingulada (Fig.16i-j). Estos datos sugieren que *Sfrp1* es necesario para extender el rango de señalización de la vía Wnt/ β -catenina desde el *hem* cortical hacia el primordio hipocampal y como consecuencia para la posterior delimitación del hipocampo.

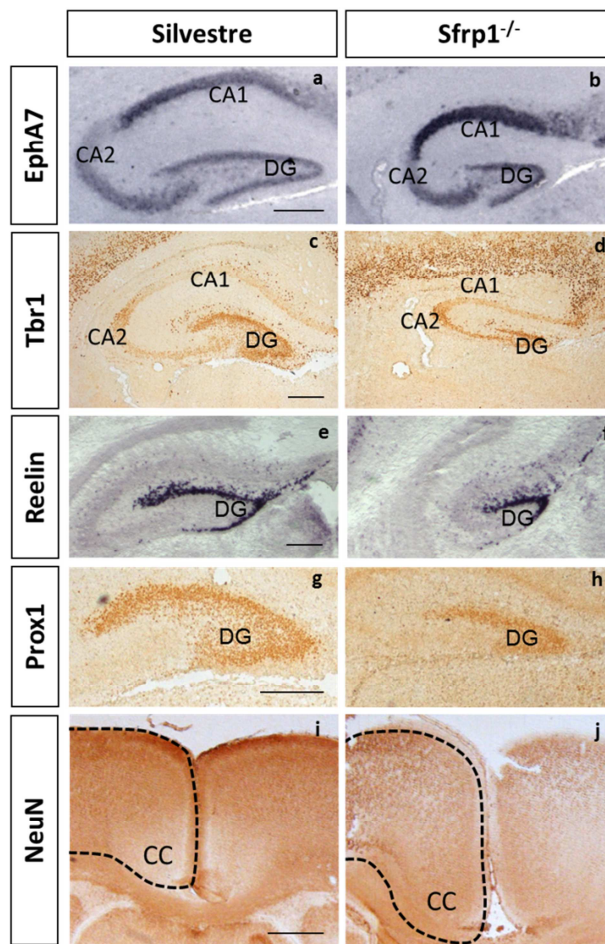


Figura 16. Los defectos debidos a la inactivación genética de *Sfrp1* en el primordio hipocampal y neocortical se reflejan en etapas posnatales en una reducción del hipocampo y una expansión de la corteza cingulada (CC). Secciones coronales de criostato de cerebros de ratones postnatales silvestres (a, c, e, g, i) y *Sfrp1*^{-/-} (b, d, f, h, j) en P7 (a-b), P4 (c-f; i-j), y P0 (g-h) hibridados con la sonda *EphA7* (a-b) y *Reelina* (e-f) o inmunoteñidas contra los anticuerpos anti-Tbr1 (c-d), anti-Prox1 (g-h) y anti-NeuN (i-j). El tamaño del hipocampo está reducido en los ratones mutantes como se aprecia a partir de los marcadores generales *EphA7* y Tbr1 (a-d). El giro dentado marcado por *reelina* y Prox1 también está reducido en los ratones mutantes (e-h). La corteza cingulada está incrementada considerablemente en los ratones *Sfrp1*^{-/-} respecto a los silvestres (i-j). Las barras de escala son 400 μ m.

Por otro lado, los ratones nulos de *Sfrp1* presentaron alteraciones en el crecimiento longitudinal y transversal del neocórtex. La dimensión antero-posterior se redujo considerablemente (Fig.17a-b; Fig.18a-b), aunque no podemos descartar que estos defectos puedan deberse a una disminución en el tamaño de los ventrículos laterales observada tanto en el desarrollo embrionario y como postnatal. A pesar del menor tamaño del cerebro, la regionalización tangencial que subdivide la corteza en distintas áreas (motora, somatosensorial, visual, etc.) no se encontraba aparentemente afectada en ratones nulos de *Sfrp1*, como se observó a partir del estudio de distintos marcadores antero-posteriores como son *COUP-TFI*, *IGF-BP* o *Ror β* , entre otros (datos no mostrados). Sin embargo, en los ratones *Sfrp1*^{-/-} se observó un incremento en el grosor del neocórtex, como se muestra con la expresión del marcador neuronal anti-NeuN (Fig.18e-i). Utilizando marcadores específicos de capa los ratones *Sfrp1*^{-/-} a P7 presentaron un incremento significativo en el número de neuronas de capas profundas Tbr1 y CTIP2 positivas (Fig.17k,l) y un incremento menor aunque significativo en el número de neuronas de capas superiores Cux1 positivas (Fig.17m). Datos similares se observaron en ratones adultos (Fig.18e-j). Estos datos indican que las alteraciones en proliferación durante la neurogénesis temprana observada en los embriones *Sfrp1*^{-/-} no se compensan posteriormente.

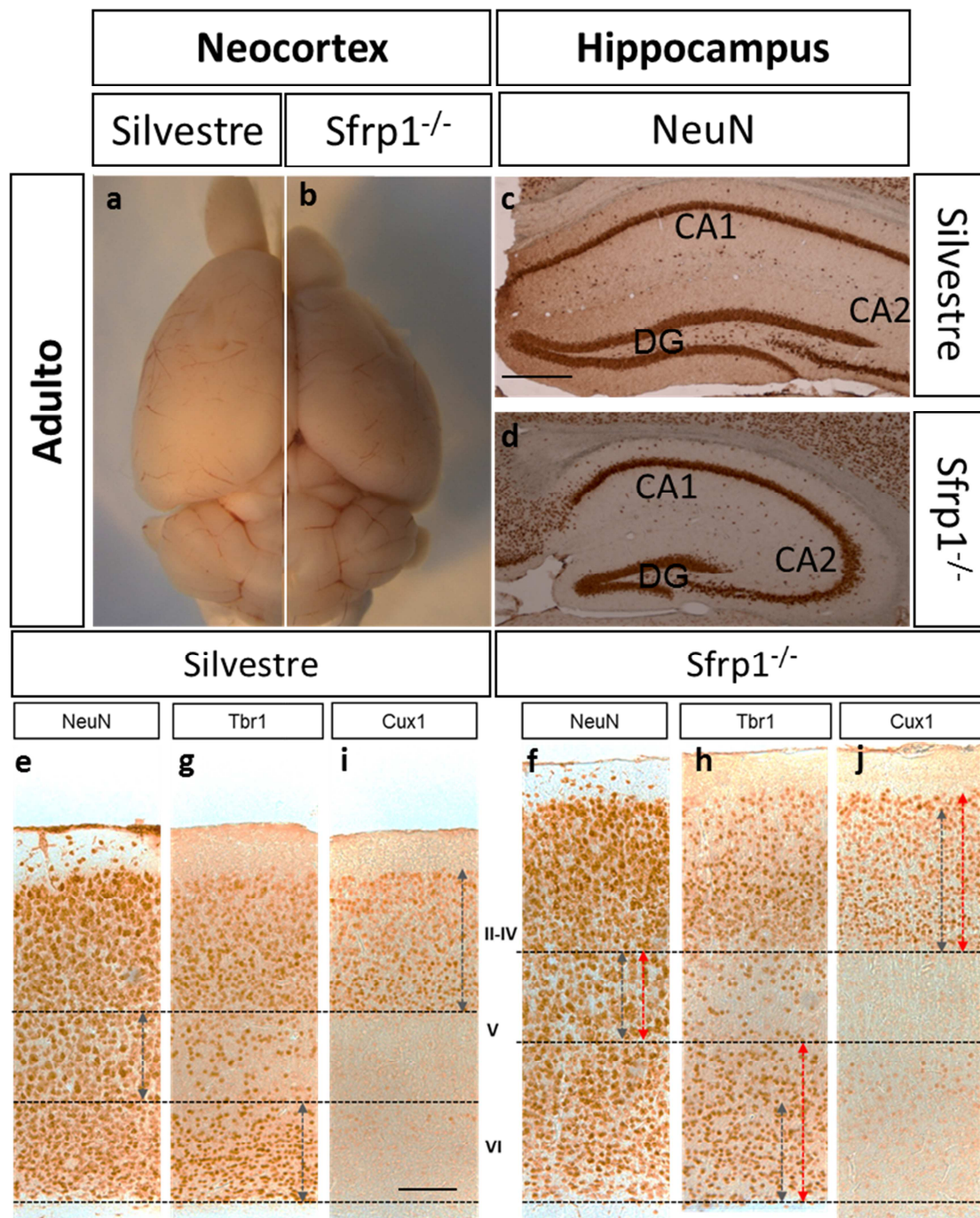


Figura 18. Las alteraciones encontradas en ratones postnatales *Sfrp1*^{-/-} se mantienen en la edad adulta. Vista dorsal del cerebro intacto de ratones adultos silvestres (a) y mutantes *Sfrp1*^{-/-} (b). Secciones coronales de criostato de cerebro ratones silvestres (c, e, g, i) y mutantes (d, f, h, j) adultos inmunoteñidas contra los anticuerpos anti-NeuN (c-d) y (e, f), anti-Tbr1 (g, h) y anti-Cux1 (i, j). Nótese como el grosor de la capa VI está incrementado en los ratones mutantes frente a los silvestres. Las barras de escala son 400 μ m (c-d) y 200 μ m (e-j).

4.2. *Sfrp1* interfiere con la proteólisis de APP, un sustrato de ADAM10

4.2.1. La proteína *Sfrp1* se localiza junto a APP y ADAM10 en las paredes del ventrículo lateral e interfiere en el procesamiento de APP.

Como se ha demostrado anteriormente la ausencia de *Sfrp1* activa de forma transitoria la vía de Notch en el palio dorsal durante el desarrollo embrionario. Este efecto se explica por el papel de *Sfrp1* como modulador negativo de ADAM10 (Esteve et al., 2011a). Nos

planteamos si *Sfrp1* también regulaba ADAM10 en el cerebro adulto. Por ello, decidimos centrarnos en la proteína APP, otro de los sustratos de ADAM10 relacionado con la EA. En estudios previos de nuestro laboratorio se observó que en cultivos celulares la adición de la proteína recombinante *Sfrp1* bloqueaba el procesamiento de APP por ADAM10 (Esteve et al., 2011a). Por ello, nos preguntamos si, de forma inversa, la proteólisis de APP por ADAM10 estaba alterada en cerebros deficientes en *Sfrp1* *in vivo*.

Para responder a esta pregunta, en primer lugar analizamos el patrón de expresión de *Sfrp1*, APP y *Adam10* en cerebros de ratones adultos. A partir de ensayos de inmunohistoquímica e hibridación *in situ* observamos que *Sfrp1* se expresa en las células de la pared lateral del ventrículo lateral y en el plexo coroideo, donde también se localiza abundantemente APP y *Adam10* (Fig.19). Así, decidimos analizar el procesamiento de APP en esta región.

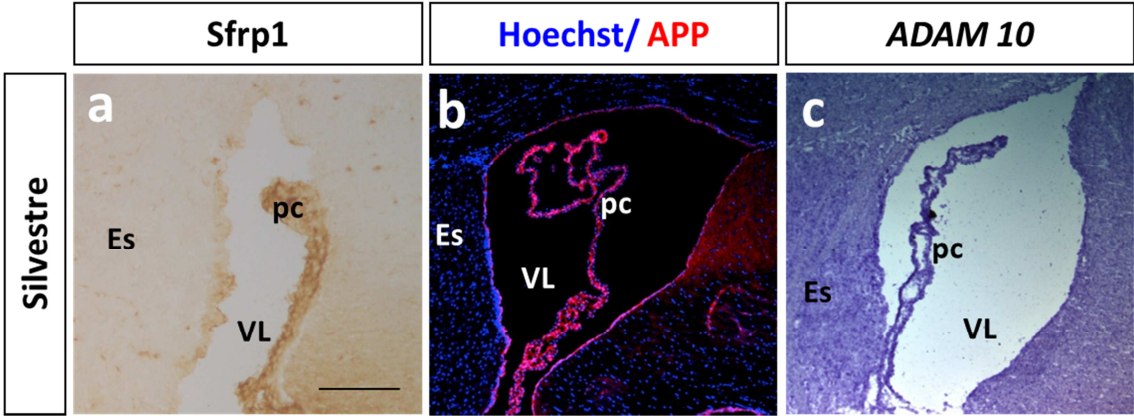


Figura 19. La expresión de *Sfrp1*, APP and *Adam10* colocalizan en el cerebro de ratón adulto. Secciones coronales de criostato de ratones silvestres adultos inmunoteñidas con los anticuerpos anti-*Sfrp1* (a) y anti-APP (b) e hibridadas con la sonda de ARNm específica para *ADAM10* (c). Nótese como la expresión de *Sfrp1* está enriquecida en la pared lateral del ventrículo lateral y en el plexo coroideo solapando con la distribución de APP y la expresión de *ADAM10*. CP Plexo coroideo; VL ventrículo lateral; Es Estriado. Las barras de escala son 200 μ m.

Ensayos de inmunohistoquímica mostraron que en animales deficientes en *Sfrp1* de 6 y 14 meses de edad, el fragmento sAPP α procedente del corte por ADAM10 se acumulaba en los bordes del ventrículo lateral en los cerebros *Sfrp1*^{-/-}, lo que contrastaba con los animales silvestres donde la acumulación no se apreciaba (Fig.20c-d). Este mismo dato lo obtuvimos en análisis previos de *western blot* (Esteve et al., 2011a). Analizamos también la presencia del péptido A β encontrando pequeñas acumulaciones en el hipocampo de los ratones silvestres que apenas se detectaban en los ratones nulos para *Sfrp1* ($p \leq 0.01$) (Fig.20e-f). Estos agregados no llegaban a formar placas amiloides ya que no se marcaban con tioflavina S, un compuesto que se une con una alta sensibilidad únicamente a estructuras fibrilares como las placas amiloides (Espargaro et al., 2012) (datos no mostrados). La distribución y expresión de la proteína APP fue similar en ambos grupos (Fig 20e-b). Además, datos del laboratorio publicados obtenidos a partir de ensayos de *western blot* mostraban que los niveles de APP

son similares en los ratones silvestres y *Sfrp1*^{-/-}, lo que indica que *Sfrp1* afecta al procesamiento de APP y no a su expresión (Esteve et al., 2011a).

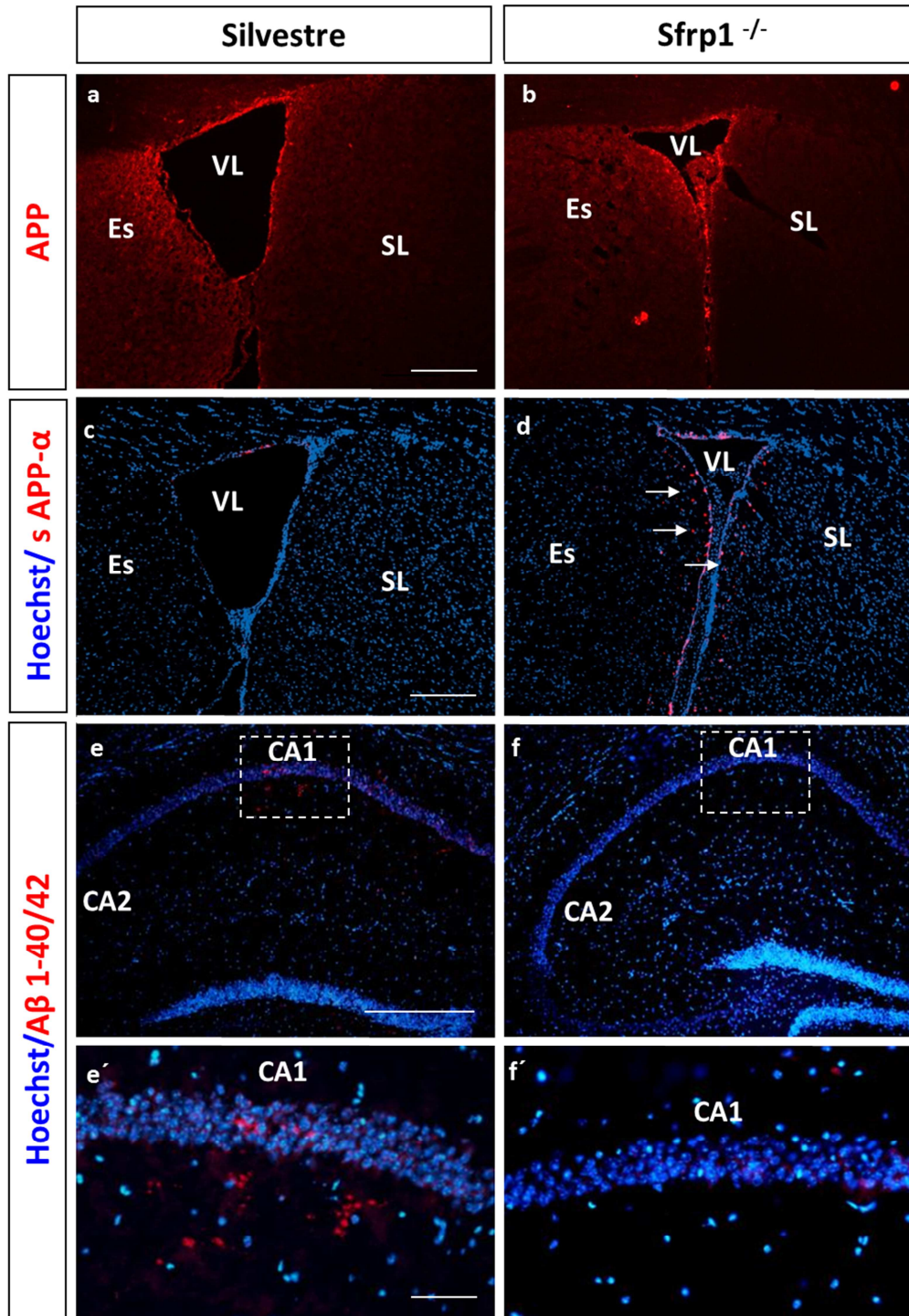


Figura 20. La inactivación genética de *Sfrp1* favorece el procesamiento de APP a través de la vía no-amiloidogénica. Secciones coronales de criostato de ratones silvestres (a, c, e) y mutantes de *Sfrp1*^{-/-} (b, d, f) adultos de 6 meses (a-d) y 14 meses (e-f) de edad, inmunoteñidas con los anticuerpos anti-APP (a, b), anti-sAPP-α (c, d) y anti-péptido Aβ 1- 40/42 (e, f). La expresión de la proteína APP es similar en los cerebros silvestres (a) y mutantes (b). Nótese que sAPP-α se localiza abundantemente en los bordes del ventrículo lateral en el cerebro *Sfrp1*^{-/-} (d) y en menor medida en el silvestre (c). Los depósitos amiloideos de Aβ se detectan escasamente en el hipocampo de los animales *Sfrp1*^{-/-} (f) comparado con los silvestres (e). VL Ventrículo lateral; Es estriado; SL Septum lateral; CA1 y CA2 *Cornu ammonis* 1 y 2. e'- f' magnificaciones. Las barras de escala son 400 μm (a-f) y 100 μm (e'- f').

De forma conjunta, estos resultados muestran que *Sfrp1* actúa sobre el procesamiento de APP *in vivo*, disminuyendo la actividad de ADAM10, lo que puede favorecer la vía amiloidogénica.

4.2.2. *Sfrp1* aumenta la producción del péptido A β y favorece su agregación en forma de placas.

Dado que en ratones deficientes en *Sfrp1* el procesamiento de APP estaba favorecido hacia la vía no amiloidogénica y debido a la importancia de APP en el desarrollo de la EA, nos preguntamos si *Sfrp1* podría contribuir al desarrollo de esta enfermedad. Para ello, cruzamos ratones *Sfrp1*^{-/-} con ratones APP/PS1, un modelo murino de EA en el cual se observan depósitos A β a los 4 meses de edad (Jankowsky et al., 2004a). Los ensayos de inmunohistoquímica en secciones de criostato utilizando el anticuerpo anti- sAPP α soluble, revelaron un acúmulo del fragmento sAPP α alrededor de los ventrículos laterales en los ratones APP/PS1/*Sfrp1*^{-/-} comparado con APP/PS1 (Fig.21).

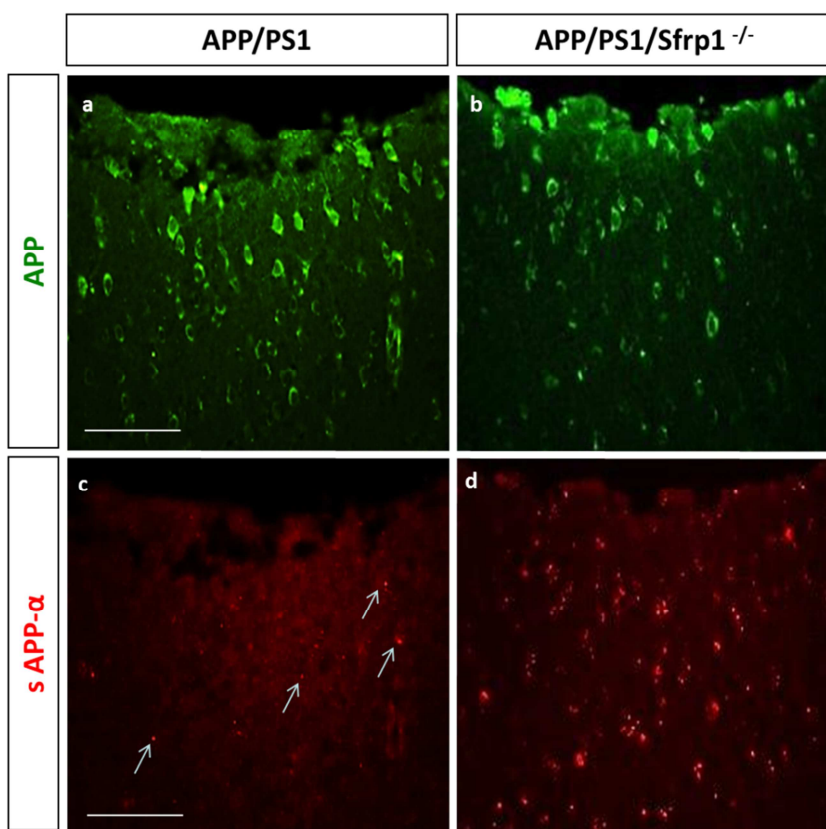


Figura 21. La inactivación genética de *Sfrp1* en un modelo de EA favorece la acumulación del fragmento sAPP- α .

Secciones coronales de criostato del neocórtex de ratones APP/PS1 (a, c) y APP/PS1/*Sfrp1*^{-/-} (b, d) adultos de 9 meses de edad inmunoteñidas contra los anticuerpos APP (a, b) y sAPP- α (c, d). La proteína completa APP se expresa en niveles similares en el cerebro de los ratones silvestres (a) y mutantes (b). Nótese que los niveles de sAPP- α son mayores en el neocórtex de los ratones *Sfrp1*^{-/-} (d) comparado con el ratón silvestre (c). Las barras de escala son 200 μ m.

Además los ensayos de inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo contra A β mostraron que los ratones APP/PS1/*Sfrp1*^{-/-} a los 4.5 meses de edad presentaban un número significativamente menor de placas ($p=0.000$) respecto a los ratones APP/PS1, estando las placas distribuidas por todo el cerebro especialmente en la corteza cerebral y el hipocampo (Fig.22a-b).

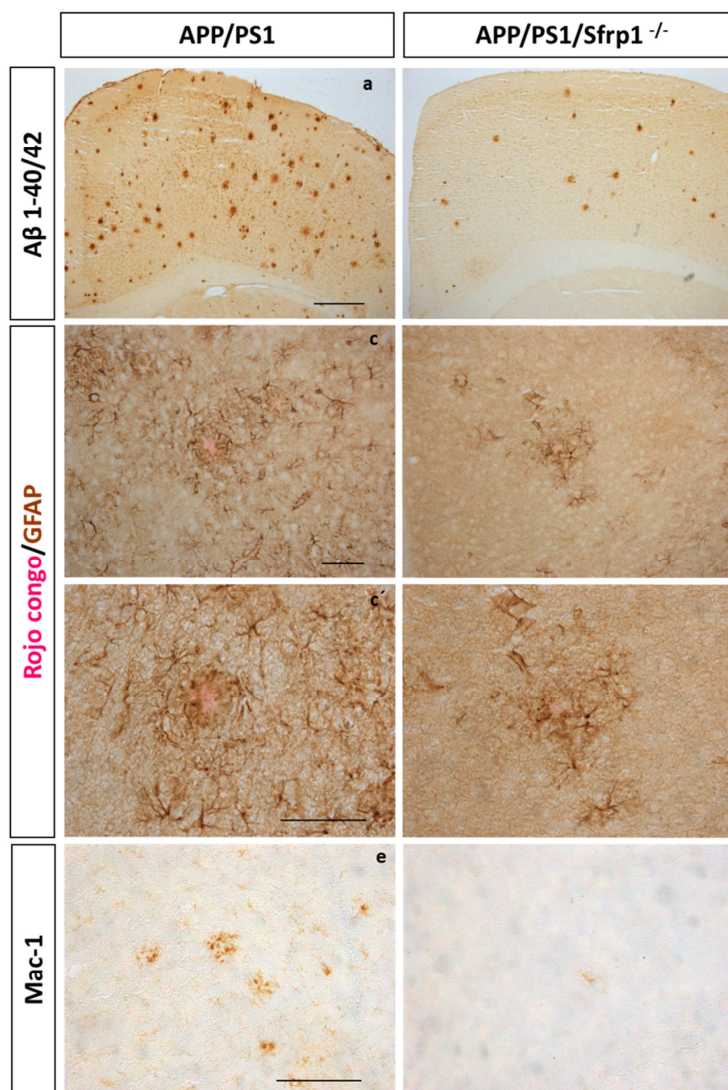


Figura 22. La inactivación de Sfrp1 en un modelo de ratón de EA disminuye el número de placas amiloides y la gliosis reactiva. Secciones coronales de criostato de ratones APP/PS1 (a, c, e) y APP/PS1/Sfrp1^{-/-} (b, d, f) adultos de 4.5 meses de edad inmunoteñidas contra los anticuerpos anti-péptido Aβ 1- 40/42 (a, b), el marcador de astrocitos anti-GFAP (c, d) y el marcador de microglía activada anti-Mac1 (e, f). Las placas se marcaron además con la tinción rojo congo (c-d). Nótese cómo en el neocórtex de los ratones APP/PS1/Sfrp1^{-/-} el número de placas amiloides se encuentra disminuido (b) comparado con los ratones APP/PS1 (a). Además, alrededor de las placas se localizan tanto astrocitos (c-d) como células de microglía activada (e-f), siendo el número de estas células menor en el ratón APP/PS1/Sfrp1^{-/-} (d, f) comparado con el ratón APP/PS1 (c, e). c', d' magnificaciones. Las barras de escala son 400 μm (a-b) y 100 μm (c-f).

Junto a las placas se observan acumulaciones de células gliales (Meyer-Luehmann et al., 2008). Con ensayos de inmunohistoquímica analizamos el proceso de gliosis utilizando el marcador “glial fibrillary acidic protein” (GFAP) de astrocitos y “macrophage antigen - 1” (Mac1) también conocido como CD11b que se expresa por las células de microglía activada y en reposo. Los análisis revelaron la presencia de astrocitos y células de microglía alrededor de las placas marcadas con la tinción con rojo Congo. Sin embargo, el número de células gliales estaba muy disminuido en los ratones APP/PS1/Sfrp1^{-/-} en comparación con los ratones APP/PS1 (Fig.22c-f). Así, estos ensayos demuestran que la gliosis relacionada con las placas está disminuida los ratones que carecen de Sfrp1.

Además, estudiamos si el número menor de placas observado en los ratones APP/PS1/*Sfrp1*^{-/-} se mantenía a lo largo del tiempo o por el contrario era un efecto transitorio compensado posteriormente. Para ello teñimos las placas con Tioflavina S a los 4.5 meses y 9 meses de edad, y observamos que las placas eran menos numerosas en los ratones APP/PS1/*Sfrp1*^{-/-} comparado con los APP/PS1 en ambas edades (Fig.23). Estos datos indican que el efecto de *Sfrp1* se mantiene a lo largo del tiempo.

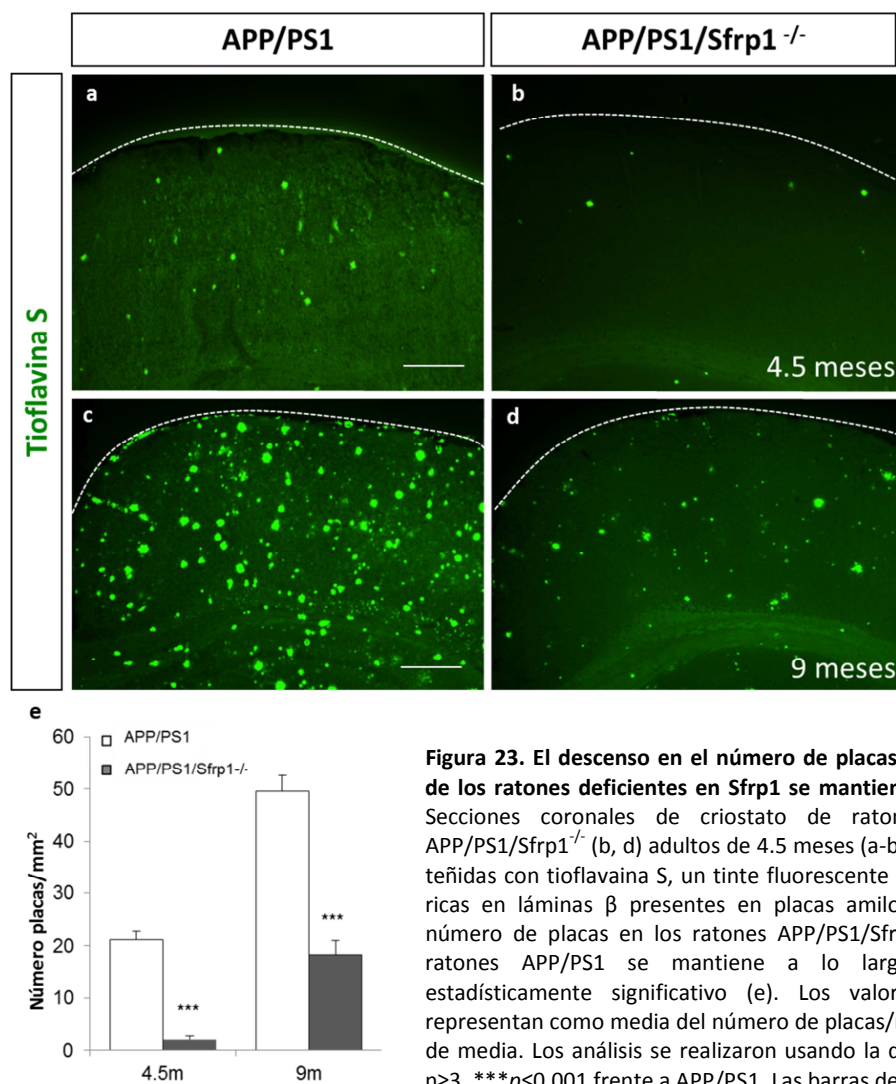


Figura 23. El descenso en el número de placas amiloides característico de los ratones deficientes en *Sfrp1* se mantiene a lo largo del tiempo. Secciones coronales de criostato de ratones APP/PS1 (a, c) y APP/PS1/*Sfrp1*^{-/-} (b, d) adultos de 4.5 meses (a-b) y 9 meses (c-d) de edad teñidas con tioflavina S, un tinte fluorescente que se une a estructuras ricas en láminas β presentes en placas amiloides. El descenso en el número de placas en los ratones APP/PS1/*Sfrp1*^{-/-} comparado con los ratones APP/PS1 se mantiene a lo largo del tiempo siendo estadísticamente significativo (e). Los valores de las gráficas se representan como media del número de placas/mm² +/- el error estándar de media. Los análisis se realizaron usando la distribución t de Student; n≥3. ***p≤0.001 frente a APP/PS1. Las barras de escala son 400 μ m.

Por tanto, todos estos datos indican que niveles bajos o nulos de *Sfrp1* favorecen el procesamiento no amiloidogénico de APP, lo que sugiere que *Sfrp1* podría contribuir a la patogénesis de la EA.

4.2.3. La inactivación genética de *Sfrp1* previene la aparición de déficits comportamentales en los ratones APP/PS1

Finalmente, nos planteamos si los cambios neuropatológicos afectaban al comportamiento de los animales. Para valorar esta posibilidad llevamos a cabo varias pruebas comportamentales.

Antes de analizar el modelo de ratón APP/PS1 comenzamos estudiando animales silvestres y *Sfrp1*^{-/-} para comprobar si la carencia de *Sfrp1* tenía algún efecto comportamental *per se*. Al valorar el rendimiento en memoria en el test de reconocimiento de objetos y el laberinto acuático de Morris no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los animales silvestres y los nulos de *Sfrp1* (Fig.24a-b). La actividad locomotora de ambos grupos de animales tampoco se modificó significativamente en ninguno de los parámetros analizados (Fig.24c). Así, parece que los defectos corticales e hipocampales presentes en los ratones deficientes en *Sfrp1* no conllevaron alteraciones severas en el comportamiento por lo que decidimos analizar estos mismo parámetros en el modelo de EA.

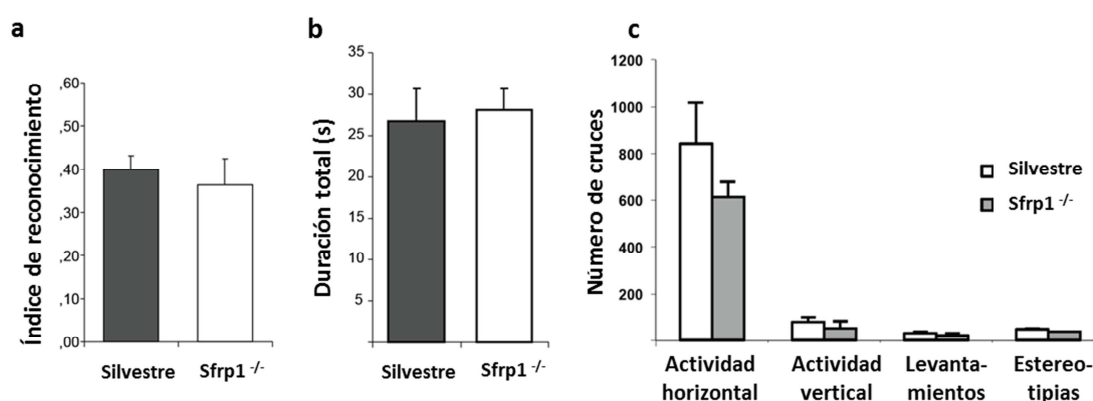


Figura 24. La inactivación de *Sfrp1* no causa defectos comportamentales. El rendimiento en el test de reconocimiento de objetos (a), en la fase de recuperación del laberinto acuático de Morris (b) así como en la exploración en campo abierto (c) de los ratones *Sfrp1*^{-/-} es similar al de los ratones silvestres. Los valores de las gráficas se representan como media \pm el error estándar de media. Los análisis se realizaron usando la distribución t de Student; $n \geq 5$.

En este caso, al analizar el rendimiento en el test de reconocimiento de objetos, los datos revelaron una diferencia significativa (analizado mediante la prueba de ANOVA) en el tiempo total usado en la exploración de los objetos nuevos entre los animales silvestres, APP/PS1 y APP/PS1/*Sfrp1*^{-/-} ($p=0.000$). Los animales APP/PS1 fallaban a la hora de reconocer el objeto nuevo mostrando alteraciones significativas en el rendimiento de memoria comparados con los ratones silvestres ($p=0.000$) o los APP/PS1/*Sfrp1*^{-/-} ($p=0.000$) (Fig.25a).

En el test de memoria espacial, el laberinto acuático de Morris, observamos que todos los ratones mejoraban su rendimiento a la hora de localizar la plataforma escondida a lo largo de los cuatro días de adquisición. Sin embargo, esta capacidad se vio gravemente alterada en los ratones APP/PS1 durante los dos últimos días (ANOVA: $p=0.003$ para el tercer día de

adquisición y $p=0.007$ para el cuarto) (Fig.25c). Para evaluar la memoria a largo plazo usamos como índice el tiempo que pasaba el animal en el cuadrante donde se localizaba la plataforma en los días anteriores. En el ensayo de recuperación los ratones APP/PS1 permanecieron menos tiempo en el cuadrante comparados con los ratones silvestres ($p=0.012$) y los animales APP/PS1/*Sfrp1*^{-/-} ($p=0.052$) (Fig.25d). Descartamos que los efectos fueran debidos a la actividad locomotora asociada al nado, ya que los tres grupos de animales recorrían una distancia similar (datos no mostrados).

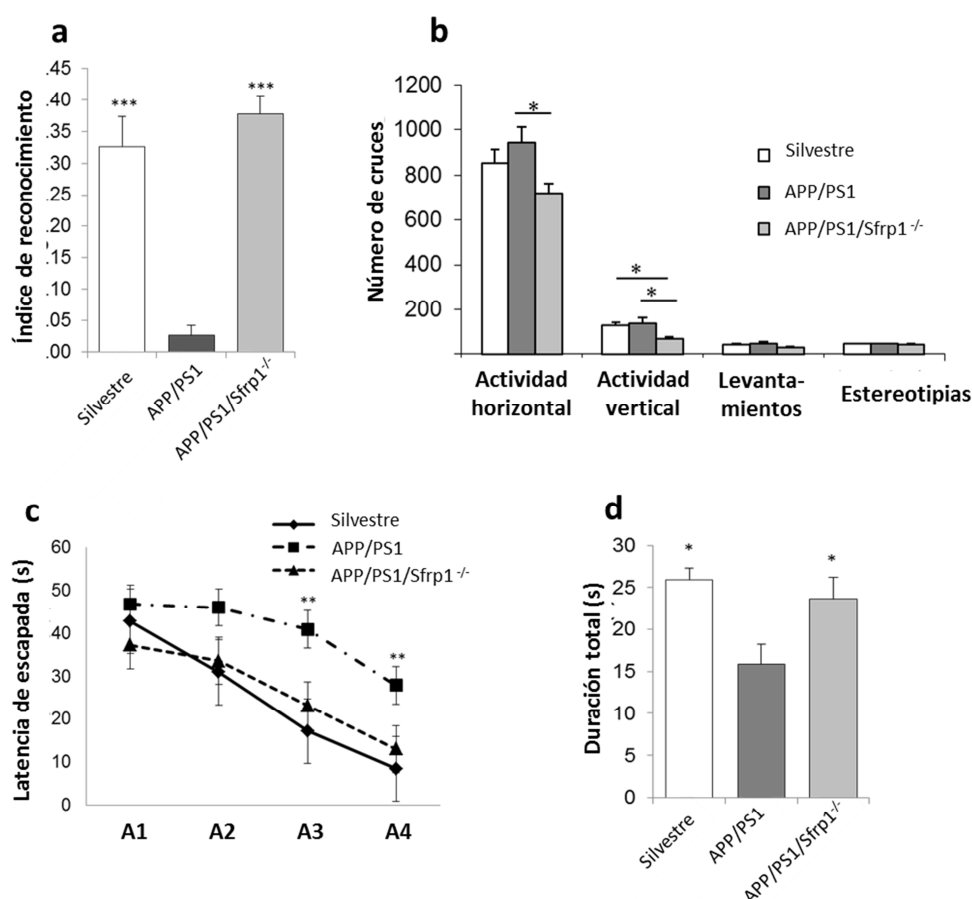


Figura 25. La inactivación de *Sfrp1* previene la aparición de déficits comportamentales en un modelo de EA. En el test de reconocimientos de objetos (a) el índice de reconocimiento se reduce significativamente en el grupo de ratones APP/PS1 en comparación con el grupo silvestre, sin embargo, esta reducción no se muestra en el grupo de ratones APP/PS1/*Sfrp1*^{-/-} siendo su rendimiento similar al grupo silvestre ($***p \leq 0.001$ frente a APP/PS1). En la exploración en campo abierto (b) los ratones APP/PS1/*Sfrp1*^{-/-} presentan un descenso en la actividad horizontal y vertical comparados con los ratones APP/PS1. Y finalmente, en el laberinto acuático de Morris tanto los índices de adquisición (c) como de recuperación (d) están reducidos en los animales APP/PS1 comparados con los animales APP/PS1/*Sfrp1*^{-/-} y silvestres (siendo la puntuación de estos dos últimos grupos similar). Los valores de las gráficas se representan como media \pm el error estándar de media. Ratones de 8 meses de edad. Los análisis se realizaron usando ANOVA de una vía seguido de test de Tukey; $n \geq 5$. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

Finalmente, en el análisis de la exploración en campo abierto los tres grupos de animales mostraron diferencias significativas en la actividad horizontal ($p=0.047$) y vertical ($p=0.012$) analizadas a través de ANOVA (Fig.25b). Los análisis *Post hoc* indicaron diferencias significativas en la actividad horizontal entre los grupos APP/PS1 y APP/PS1/*Sfrp1*^{-/-} ($p=0.041$) y diferencias significativas en la actividad vertical entre el grupo APP/PS1/*Sfrp1*^{-/-} comparado con

ratones silvestres ($p=0.033$) y APP/PS1/*Sfrp1*^{-/-} comparado con ratones APP/PS1 ($p=0.017$). En todos los casos el nivel de actividad de los ratones APP/PS1/*Sfrp1*^{-/-} era menor en comparación con el resto de grupos, lo cual permite excluir que los efectos hallados en los test previos se debieran a un incremento en la locomoción. Además, no se encontraron diferencias significativas en el número de levantamientos ni de estereotipias. Al igual que en los casos previos descartamos que los efectos fueran debidos al genotipo simple *Sfrp1*^{-/-} ya que estos animales tuvieron un comportamiento similar a los controles.

Por tanto, podemos afirmar que la inactivación genética de *Sfrp1* no tiene un efecto por si misma pero previene los defectos comportamentales característicos de un modelo de ratón de EA, observándose así una correlación entre los efectos histológicos/bioquímicos y los comportamentales de este grupo de animales.

De forma conjunta, los datos presentados hasta el momento demuestran que *Sfrp1* juega un papel significativo tanto en el desarrollo de la corteza cerebral durante la etapa embrionaria, al intervenir sobre la formación del hipocampo y del neocórtex, como en el procesamiento de APP y la gliosis asociada.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

Durante el desarrollo del ojo se ha demostrado que las Sfrps modulan positivamente la señalización Wnt y negativamente la actividad de ADAM10 afectando a la especificación y neurogénesis de la retina. En este estudio demostramos que esta doble función también se produce en el telencéfalo embrionario (Fig.29). Así, la inactivación genética de *Sfrp1* modifica la proporción entre el primordio hipocampal y el neuroepitelio cortical y favorece la proliferación de los precursores y la neurogénesis neocortical. Junto a estos efectos en el desarrollo embrionario demostramos también que *Sfrp1* regula el procesamiento de APP en la corteza cerebral adulta, lo que abre una importante puerta en relación a la EA.

5.1. *Sfrp1* contribuye al desarrollo de la corteza cerebral

5.1.1 *Sfrp1* es necesario para el establecimiento de la proporción entre territorio neocortical y el territorio hipocampal

La especificación del primordio hipocampal está regulada por la vía de Wnt/ β -catenina (Galceran et al., 2000; Lee et al., 2000; Yoshida et al., 2006; Zhou et al., 2004). Así, la sobreexpresión de moléculas que regulan negativamente la activación de esta vía, como el antagonista *Dkk1* (Solberg et al., 2008) o que influye en la expresión de sus ligandos Wnts, como *Fgf8* (Shimogori et al., 2004), afectan a su correcto desarrollo.

Nuestros datos indican que *Sfrp1* se localiza en un gradiente latero^{alto}-medial^{bajo} en el palio y contribuye a mantener la correcta proporción entre el primordio del hipocampo y el resto del campo cortical. Por ello, la eliminación genética de *Sfrp1* produce una expansión del primordio neocortical caracterizado por la expresión del FT *Foxg1*^{alto}, a expensas del hipocampal definido por la expresión de *Lef1*^{alta} y de *Foxg1*^{bajo} (Galceran et al., 2000; Muzio and Mallamaci, 2005). Esta reducción del primordio hipocampal durante el desarrollo embrionario, conlleva alteraciones en el adulto, donde observamos una disminución de las regiones CA y del giro dentado, sin afectar, sin embargo, a los procesos de memoria dependientes de hipocampo como indican los resultados en el test de Morris. Paralelamente, la expansión del primordio neocortical se refleja en la etapa postnatal en un incremento de la corteza cingulada.

Sfrp1 es un modulador positivo y negativo de la vía de señalización de Wnt (Esteve et al., 2011b; Uren et al., 2000; Xavier et al., 2014). La reducción de la expresión de la diana directa axina2, indica que en ausencia de *Sfrp1*, la vía de Wnt/ β -catenina se activa menos que en una situación control, sugiriendo que en este caso *Sfrp1* actúa como un modulador positivo. Esta situación sería similar a la descrita durante el desarrollo de la retina, donde la vía de la β -catenina es necesaria para especificar la retina periférica frente a la retina central. En este caso, la ausencia de *Sfrp1*/*Sfrp2* causa una pérdida de retina periférica y una expansión de la central, ya que *Sfrp1* es necesario para permitir la dispersión de los ligandos Wnt en el espacio

extracelular (Esteve et al., 2011b). En *Xenopus* también se ha demostrado que las Sfrps actúan como transportadores de los ligandos Wnt, expandiendo así el área de señalización de Wnt/ β -catenina (Mii and Taira, 2009). Es por tanto posible especular que en el palio medial Sfrp1 funcione de una forma similar, actuando como un transportador de los Wnts expresados en el *hem* cortical y por lo tanto permitiendo una correcta difusión de los ligandos desde el *hem* cortical hacia el primordio hipocampal. Alternativamente, dado que se ha demostrado que Sfrp1 es un antagonista de la vía no canónica (Matsuyama et al., 2009) la cual es un regulador negativo de la vía canónica (Grumolato et al., 2010; Li et al., 2011; Yan et al., 2001) podría argumentarse un efecto indirecto sobre la vía Wnt/ β -catenina. Sin embargo, en retina se ha descartado esta posibilidad (Esteve et al., 2011b). También se ha demostrado que la inactivación de Fzd5, un receptor Wnt no canónico, no tiene efecto tampoco sobre la neurogénesis (Liu et al., 2008).

Otro defecto observado en los embriones *Sfrp1*^{-/-} es la reducción del territorio del *hem* cortical como se desprende del dominio de expresión de los genes *Wnt2b*, *Wnt3a* y *Wnt5a*. Sfrp1 no se expresa en el *hem* cortical lo que sugiere un efecto indirecto que en este caso puede venir dado por los FT *Foxg1* y *Lhx2*. Dado que estos FT regulan negativamente la expresión de Wnt (Mangale et al., 2008; Muzio and Mallamaci, 2005), la expansión observada en los mismos en ratones que carecen de Sfrp1 explica la reducción del *hem* cortical.

Wnt/ β -catenina no sólo afecta a la especificación del hipocampo, sino también modula la proliferación y la migración de las células progenitoras granulares como muestran los animales nulos de *Lef1* y *LRP6* o bajo la expresión ectópica del antagonista de la vía *Dkk1* (Galceran et al., 2000; Solberg et al., 2008; Zhou et al., 2004). Sin embargo, los embriones *Sfrp1*^{-/-} presentan mayor activación de la vía de Notch en el palio medial, como se desprende de la expresión de la diana directa *Hes5*, un FT relacionado con el mantenimiento de la identidad de glía radial y el aumento en la proliferación (Gaiano et al., 2000; Mizutani et al., 2007). Por tanto, las alteraciones hipocampales en los embriones *Sfrp1*^{-/-} se deben a un defecto de patrón más que a fallos en la proliferación.

En su conjunto estos resultados demuestran que la función endógena de Sfrp1 en el palio medial es el mantenimiento de la proporción de tamaño entre el primordio hipocampal y el primordio neocortical (Fig. 26) actuando como un modulador positivo de la vía Wnt/ β -catenina. Proponemos que en el palio medial Sfrp1 favorece la expansión de las proteínas Wnt con el consecuente efecto sobre el desarrollo de la futura formación hipocampal, de forma similar a lo que ocurre en la retina.

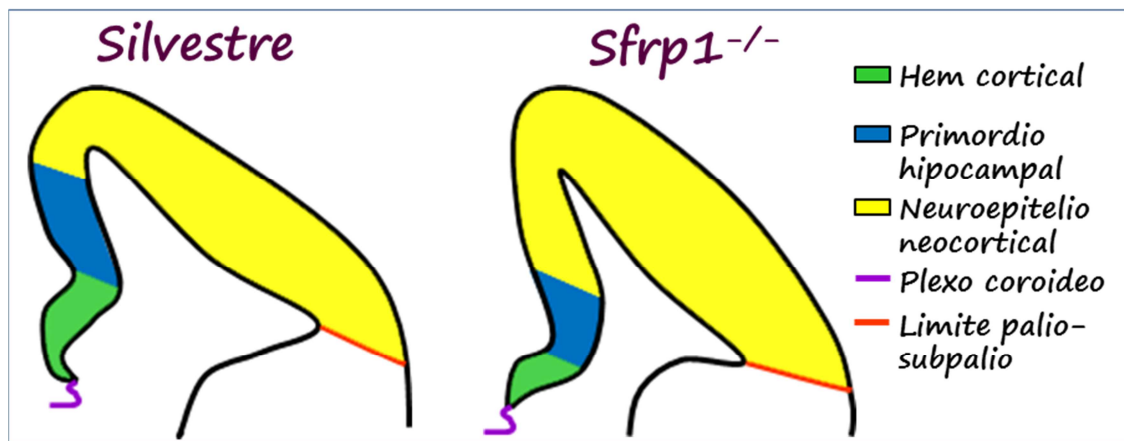


Fig. 26. Papel de *Sfrp1* en el desarrollo hipocampal (E12.5). La ausencia de *Sfrp1* produce una expansión del neuroepitelio neocortical (amarillo) a expensas del primordio hipocampal (azul). Además el *hem* cortical (verde) también se ve reducido en estos embriones. El plexo coroideo y el límite palio-subpalio no se ve afectado en los ratones *Sfrp1*^{-/-}.

5.1.2. *Sfrp1* modula la proliferación de los precursores neurales y la neurogénesis

El desarrollo de la corteza cerebral depende de los procesos de regionalización pero también de proliferación. En este sentido, la corticogénesis está finamente regulada por factores intrínsecos y extrínsecos que afectan al repertorio de generación de distintos subtipos neuronales (Elsen et al., 2013; Greig et al., 2013; Martynoga et al., 2012). Al estudiar la función de *Sfrp1* en el palio dorsal, donde se expresa abundantemente, encontramos que esta proteína regula la proliferación de los progenitores neocorticales y afecta al número de neuronas diferenciadas (Fig.27).

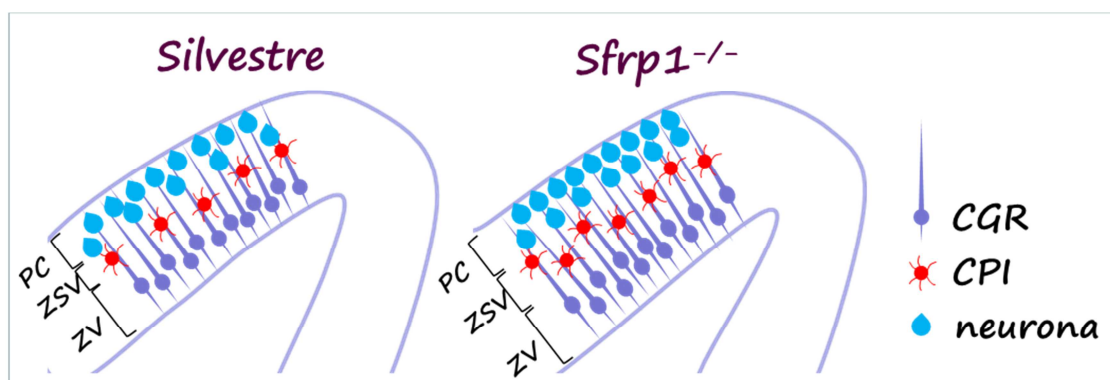


Fig. 27. Papel de *Sfrp1* en la neurogénesis embrionaria cortical (E13.5). La ausencia de *Sfrp1* produce un engrosamiento del palio dorsal encontrándose un aumento en el número de progenitores, tanto de las CGR (morado) como de las CPI (rojo) y en el número de neuronas diferenciadas (azul). Células de glía radial CGR, Células progenitoras intermedias CPI, Placa cortical PC, zona subventricular ZSV y zona ventricular ZV.

Nuestros resultados muestran que en etapas tempranas del desarrollo la inactivación genética de *Sfrp1* incrementa el número de los progenitores neurales en el palio dorsal al igual que se observó en retina neural (Esteve et al., 2011a). Los mecanismos moleculares que

explican estos efectos son al menos dos, por una lado la vía de Notch y por otro la vía β -catenina.

Se ha demostrado que la vía de Notch es necesaria para mantener la auto-renovación de las CGR durante la embriogénesis (Gaiano et al., 2000) a través de mecanismos dependientes de CSL/CBF1 (Mizutani et al., 2007). Para activar la vía, una vez unido el ligando, el receptor Notch debe ser procesado por ADAM10 y posteriormente por el complejo γ -secretasa, generándose el fragmento NICD (Hartmann et al., 2002; Jorissen et al., 2010). En este sentido, el telencéfalo de los embriones *Sfrp1*^{-/-} presenta un incremento en el fragmento NICD y como consecuencia una expresión aumentada de *Hes5*, una diana directa de la vía de Notch, lo que indica un mayor procesamiento del receptor y por tanto de la activación de la vía canónica. Por tanto, *Sfrp1* en el neocórtex, de forma similar a lo que sucede en la retina central (Esteve et al., 2011a), actúa como un regulador negativo de la actividad de ADAM10 afectando a la proliferación de las CGR.

Sin embargo, el incremento en la expresión de *Hes5* en los ratones *Sfrp1*^{-/-} es transitorio y se restringe a la corticogénesis temprana ya que en periodos posteriores su expresión disminuye. Este efecto transitorio tiene al menos dos explicaciones. Por un lado el patrón dinámico de localización de *Sfrp1*. En estadios tempranos la proteína *Sfrp1* se localiza de forma abundante en la ZV, coincidiendo con la expresión de los receptores Notch, mientras que con el paso del tiempo difunde hacia la ZSV, donde se encuentran los ligandos de Notch (Yoon et al., 2008). ADAM10 procesa tanto los receptores como los ligandos Notch, activando e inhibiendo respectivamente la vía (Yang et al., 2006). Por tanto, la difusión de *Sfrp1* podría estar detrás incremento inicial y disminución posterior de la activación de Notch. Alternativamente, otra explicación puede estar en el agotamiento del grupo de progenitores. Aunque a partir de los resultados relativos a la mitosis en la ZV se detecta en estadios tardíos un ligero incremento en el número de células número total de células PH3 positivas que no llega a ser significativo.

Los miembros de la familia *Hes* reducen la transcripción de los ligandos de Notch (Shimojo et al., 2008), sin embargo, el número de células que expresan *Dll1* en los embriones mutantes *Sfrp1* está incrementado en estadios tempranos. Se ha demostrado que la fuente primaria de ligandos viene no sólo de las neuronas recién generadas sino también las CPI que pueden influir positivamente en el mantenimiento y la proliferación las CGR al actuar como células presentadoras de los ligandos Notch (Yoon et al., 2008). En esta misma línea se ha descrito que las CPI son una fuente de *Dll1* que interaccionan dinámicamente con las CGR (Nelson et al., 2013). Así, el alto número de CPI y el incremento en el número de neuronas diferenciadas en embriones mutantes *Sfrp1* explican el mayor número de células que expresan *Dll1*. Sin embargo, este efecto no se va a trasladar en una mayor activación de la vía con el

paso del tiempo debido a la acción de ADAM10 sobre los ligandos anteriormente explicado (Yang et al., 2006).

El papel de Notch sobre las CPI es opuesto al que ejerce en las CGR ya que la activación de la vía impide la iniciación de la cascada Ngn2-Tbr2 (Ochiai et al., 2009) evitando así la transición de CGR a CPI (Nelson et al., 2013; Ohata et al., 2011). Esto contrasta con el aumento del número de mitosis de las CPI y el incremento de CPI observado en los embriones nulos para *Sfrp1* durante la neurogénesis temprana. Sin embargo, el papel multifuncional de *Sfrp1* y su relación con la vía β -catenina puede explicar esta situación. El ratón reportero de *Axina2* en E14.5 revela una menor señalización β -catenina en la ZSV frente a la ZV (Mutch et al., 2010) siendo la vía aún activa en las CPI neocorticales (Munji et al., 2011). En los ratones nulos de *Sfrp1*, a pesar de presentar una ZSV incrementada, esta diferencia no se aprecia en E12.5 debido a la menor activación de la vía como se observa a partir del descenso en la expresión de la *axina2*. Wnt/ β -catenina funciona como un regulador negativo en la generación de las CPI (Kuwahara et al., 2010; Mutch et al., 2010; Wrobel et al., 2007), retrasa la transición de CGR a CPI (Kuwahara et al., 2010; Wrobel et al., 2007) e induce la diferenciación temprana de las CPI en neuronas (Munji et al., 2011). Por tanto, este descenso en la activación de la vía podría explicar el incremento en el número de CPI en los animales nulos de *Sfrp1*. Sin embargo, debido a la relación precursor-producto entre las CGR y las CPI es difícil aislar los efectos de la vía Wnt/ β -catenina sobre las CPI (Harrison-Uy and Pleasure, 2012).

β -catenina además de jugar un papel sobre la transcripción, también está implicada en los procesos de adhesión célula-célula al estar unida a N-cadherina, o en la polaridad. La pérdida de estas dos funciones produce una conversión inmediata de CGR a CPI (Cappello et al., 2006). N-cadherina es un sustrato de ADAM10 (Pruessmeyer and Ludwig, 2009), que mantiene la adhesión de las CGR por uniones homofílicas. También activa la vía β -catenina de forma independiente a Wnt a través de la actuación de Akt, manteniendo así el nicho de células progenitoras (Zhang et al., 2013; Zhang et al., 2010). Sin embargo, a partir de nuestros datos no podemos concluir que los embriones deficientes en *Sfrp1* presenten un mayor procesamiento de N-cadherina. Por tanto, sería necesario explorar esta posibilidad en mayor detalle.

Finalmente, la inactivación genética de *Sfrp1* conlleva un incremento en el número de las primeras neuronas en diferenciarse y cambios en el neocórtex postnatal. El aumento en la proliferación observado en los mutantes *Sfrp1*^{-/-} no se compensa con el paso del tiempo y se refleja en un mayor grosor cortical debido al aumento del número de células en las capas profundas y en menor medida en las superficiales. A pesar de los defectos corticales, la memoria de reconocimiento y la espacial así como la actividad locomotora de estos animales no se encuentra afectada significativamente.

Por tanto, los resultados presentados aquí demuestran que Sfrp1 es un factor extrínseco que influye en la proliferación de las dos principales poblaciones de progenitores a través de la modulación de la actividad de la vía de Notch y de la vía β -catenina. Este efecto se refleja postnatalmente en cambios significativos neocorticales.

5.2. Sfrp1 regula el procesamiento de APP

Tras el desarrollo embrionario de la corteza cerebral, ésta es susceptible de alterarse a lo largo de todo el ciclo vital. La EA es uno de los trastornos neurodegenerativos más comunes asociados a la corteza, que se caracteriza por una sobreproducción o falta de eliminación del péptido A β y la agregación del mismo en formas de placas seniles, hiperfosforilación de Tau e inflamación, entre otras alteraciones (Querfurth and LaFerla, 2010). Por ello, es importante determinar qué factores están implicados directa o indirectamente en la generación de dicho péptido para mejorar el diagnóstico o tratamiento de este cuadro. Sfrp1 se detecta en la edad adulta (Augustine et al., 2001) y su expresión aumenta en la EA (Blalock et al., 2004), lo que sugiere un papel para Sfrp1 en esta enfermedad. Aquí este papel se confirma ya que demostramos que Sfrp1 tiene capacidad para modular el procesamiento de APP (Fig. 28) tanto en animales silvestres como en un modelo de EA.

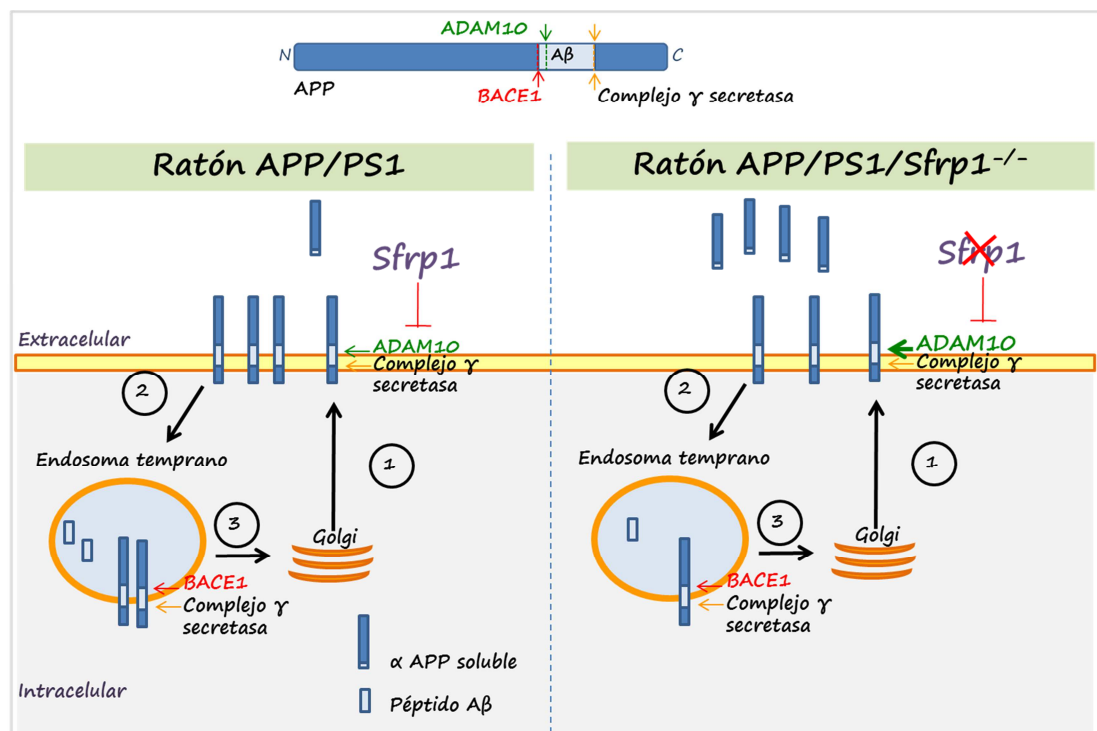


Fig. 28. Papel de Sfrp1 sobre el procesamiento de APP. En un modelo de EA, APP recién sintetizado pasa del aparato de Golgi a la membrana plasmática donde será procesado por la vía no amiloidogénica (ADAM10 y complejo γ secretasa) generando el fragmento soluble sAPP α (1). La proteína no procesada pasa entonces al endosoma temprano donde se procesará por la vía amiloidogénica (BACE1 y el complejo γ -secretasa) favoreciendo la generación del fragmento A β (2). Finalmente la proteína APP no procesada volverá al aparato de Golgi (3) repitiéndose el ciclo anterior. En ausencia de Sfrp1, la actividad de ADAM10 aumenta, lo que produce un incremento en los niveles del fragmento soluble sAPP α y como consecuencia un descenso en el péptido A β por quedar menos APP sin procesar. Nota: esquema simplificado donde sólo se muestran los fragmentos sAPP α y A β .

La proteólisis amiloidogénica de APP se lleva a cabo por la β -secretasa BACE1 mientras que la no-amiloidogénica se produce a través de la actividad α -secretasa ADAM10, y bajo condiciones específicas ambas vías pueden competir (Kim et al., 2008; Postina et al., 2004). Nuestros datos demuestran que la inactivación genética de *Sfrp1* favorece el procesamiento no amiloidogénico frente al amiloidogénico. Esta conclusión se deriva inicialmente a partir de varios datos. En primer lugar, APP, ADAM10 y *Sfrp1* se expresan de forma muy abundante en el epéndimo que rodea los ventrículos laterales. En segundo lugar, la generación del fragmento sAPP α está incrementada alrededor de los ventrículos en ratones nulos para *Sfrp1* comparado con los silvestres durante la edad adulta, lo que confirma de nuevo el papel de *Sfrp1* como modulador negativo de la actividad ADAM10. Y en tercer lugar, los agregados del péptido A β en ratones deficientes en *Sfrp1* se reducen.

Para profundizar en el papel de *Sfrp1* sobre el procesamiento de APP y sus implicaciones comportamentales usamos modelo murino de EA donde se favorece el corte mediado por la β -secretasa BACE1 y el desplazamiento de la ratio A β 40:42 hacia A β 42. En este modelo la deficiencia de *Sfrp1* inhibe la formación del péptido A β como se observa a partir del descenso en el número de placas amiloides en los ratones APP/PS1/*Sfrp1*^{-/-} comparado con los ratones APP/PS1. La actividad de ADAM10 previene la producción del péptido A β (Kojro et al., 2001; Postina et al., 2004; Tippmann et al., 2009; Vassar et al., 1999) al proteolizar APP dentro del dominio A β (Kuhn et al., 2010) y a través de la modulación negativa que ejerce el fragmento sAPP α sobre BACE1 (Obregon et al., 2012). Así, la deficiencia en *Sfrp1* tanto en ratones silvestres como en un modelo de EA disminuye la carga amiloidea, siendo este descenso mantenido a lo largo del tiempo.

Junto a ello, también observamos una disminución en la astrogliosis y microgliosis, lo que sugiere que estos ratones presentan un proceso inflamatorio reducido. La activación de células microgliales y de astrocitos puede producirse por los oligómeros del péptido A β , especialmente los dímeros (Haass and Selkoe, 2007; Jin et al., 2011; Walsh and Selkoe, 2007) ya que inducen neuroinflamación (Hardy and Selkoe, 2002; Querfurth and LaFerla, 2010). En este sentido, la eliminación condicional de ADAM10 bajo el promotor de la CaMKII α , además de aumentar la carga amiloidea, induce astrogliosis y microgliosis (Prox et al., 2013). Estos efectos son consistentes con nuestros datos, puesto que en los ratones APP/PS1/*Sfrp1*^{-/-}, al presentar una mayor funcionalidad de ADAM10, se reduce tanto la carga amiloidea como los procesos inflamatorios asociados.

La actividad de ADAM10, además de prevenir la producción del péptido A β , favorece la generación del fragmento sAPP α , así una actividad disminuida de ADAM10 produce descensos en los niveles de sAPP α junto a un aumento en la producción de péptidos A β (Epis et al., 2010; Kim et al., 2009; Suh et al., 2013). Los ratones APP/PS1/*Sfrp1*^{-/-} presentan un incremento en los

niveles del fragmento sAPP α comparado con los ratones APP/PS1. Por tanto y de forma conjunta, la inactivación genética de Sfrp1 favorece el procesamiento no amiloidogénico de APP, como se desprende del descenso en el número de placas y el incremento en el fragmento sAPP α . Por ello, niveles altos de Sfrp1 podrían ser un factor de riesgo para la EA al regular negativamente la actividad proteolítica de ADAM10.

La homología estructural entre el dominio NTR de Sfrp1 (dominio C-terminal) y las TIMPs (dominio N-terminal) (Banyai and Patthy, 1999; Bovolenta et al., 2008) sugiere una funcionalidad parecida para estas proteínas como moduladores negativos de metaloproteinasas, repercutiendo sobre el procesamiento de APP y por tanto interviniendo en la EA. Así, la sobreexpresión de TIMP3 o el tratamiento con medio condicionado rico en TIMP3 en células COS-7 provocan un descenso en los niveles de APP y ADAM10 en la membrana plasmática, sin afectar su expresión total. Se reduce de esta forma la proteólisis no-amiloidogénica favoreciéndose la amiloidogénica lo que da como resultado un aumento en la producción del péptido A β (Hoe et al., 2007). Aunque nuestros resultados apuntan en la misma dirección el mecanismo de acción es diferente, mientras que TIMP3 afecta a la localización de ADAM10 y APP en la membrana plasmática (Hoe et al., 2007) Sfrp1 modifica la actividad proteolítica de esta enzima (Esteve et al., 2011a), siendo posible que las diferencias en la estructura del dominio NTR expliquen los distintos mecanismos de supresión de las metaloproteinasas (Oldefest et al., 2015) o que el dominio CRD de Sfrp1 sea necesario para regular la actividad de ADAM10. Cabe destacar que los niveles proteicos de TIMP3 están incrementados en el hipocampo de humanos con EA (Hoe et al., 2007). Además, resultados de nuestro laboratorio demuestran que los niveles de ARNm y proteína Sfrp1 están aumentados tanto en un modelo murino de EA como en el cerebro y plexo coroideo de pacientes con esta enfermedad (artículo en preparación).

El papel Sfrp1 como inhibidor de proteinasas es compartido por otros miembros de la familia de Sfrp. Así, Sizzled y Crescent, dos proteínas no presentes en mamíferos, inhiben proteinasas tipo Tolloid/BMP1 (Bijakowski et al., 2012; Lee et al., 2006; Ploper et al., 2011). Sfrp3, por otro lado disminuye la expresión de MMP9 en células de cáncer de próstata a través de la vía β -catenina (Zi et al., 2005); y recientemente se ha demostrado que Sfrp3 actúa como un inhibidor de la actividad proteasa de ADAM17 en los condrocitos (Oldefest et al., 2015). Por tanto, parece que es una función común para las proteínas Sfrps.

Los cambios bioquímicos encontrados en los ratones APP/PS1/Sfrp1^{-/-} tienen consecuencias comportamentales. Por ello, estos animales presentan un mejor rendimiento en todos los test utilizados comparado con los ratones APP/PS1. Esta diferencia puede ser debida a la disminución del péptido A β . La neurotoxicidad del péptido A β y su efecto negativo sobre los procesos de memoria se debe mayoritariamente a su sobreproducción o su falta de

eliminación (Palop and Mucke, 2010; Walsh and Selkoe, 2007) ya que la presencia de bajas concentraciones de A β tiene una función fisiológica no patológica que mejora la plasticidad sináptica y la memoria (Kamenetz et al., 2003; Palop and Mucke, 2010; Puzzo et al., 2008; Puzzo et al., 2012). Se ha descrito que los oligómeros de A β procedentes de cerebros humanos con EA e inyectados en roedores vivos disminuye la potenciación a largo plazo (LTP) en el hipocampo y altera los procesos de memoria (Cleary et al., 2005; Gong et al., 2003; Haass and Selkoe, 2007; Shankar et al., 2008; Walsh et al., 2002) siendo estos efectos neutralizados con la adición del anticuerpo contra A β (Klyubin et al., 2005).

Además, cabe destacar el papel neuroprotector sAPP α soluble. Una mutación en APP que evita que se produzca el corte en el sitio alfa lleva a los animales a una neurodegeneración severa y defectos comportamentales (Moechars et al., 1996). Por el contrario, la infusión intracerebroventricular (icv) del fragmento sAPP α aumenta el rendimiento en memoria en ratones silvestres favoreciendo la consolidación de memoria y revirtiendo la amnesia causada por la administración del antagonista colinérgico escopolamina (Meziane et al., 1998). El fragmento sAPP α también incrementa la LTP (Ishida et al., 1997) y corrige los daños en memoria espacial y en la LTP presentes en ratones nulos de APP (Ring et al., 2007). Asimismo, en pacientes de EA los niveles del fragmento sAPP α en el LCR están disminuidos, lo que correlaciona con los defectos en memoria (Almkvist et al., 1997; Fellgiebel et al., 2009; Sennvik et al., 2000).

Finalmente, aunque la EA se considera como una enfermedad relacionada con el acúmulo de amiloide, otras investigaciones sugieren que la causa primaria no es el péptido A β sino otras variables como por ejemplo, el efecto de la hiperfosforilación de Tau, la inflamación, el fallo de la autofagia y la función lisosomal, las alteraciones mitocondriales o la pérdida de la homeostasis del Ca $^{2+}$, entre otros (Querfurth and LaFerla, 2010). La EA es una entidad patológica compleja que no se explica fácilmente con el modelo lineal simple de la hipótesis de la cascada amiloidea (Herrup, 2015). El péptido A β parece ser necesario pero no suficiente para causar EA, desencadenando los cambios patogénicos del cerebro que finalmente culminan en neurodegeneración y pérdida de la integridad de la red neuronal cerebral (Musiek and Holtzman, 2015). Así, además del papel de Sfrp1 sobre la actividad de ADAM10, otras alternativas pueden ser relevantes como por ejemplo su relación con la vía Wnt.

La vía Wnt se relaciona con la EA fundamentalmente por su función sobre la plasticidad sináptica, la cual se encuentra gravemente alterada en pacientes con EA como se demuestra por la disminución de la densidad sináptica y la atrofia neurítica (Herrup, 2015). Existen datos que asocian tanto la señalización canónica como la no canónica con la EA. En relación con la primera cabe destacar que en pacientes con EA se detectan niveles altos de DKK1 en biopsias de cerebro, una proteína que específicamente inhibe la vía Wnt/ β -catenina,

junto a descensos en la expresión del correceptor LRP6 y por tanto disminución de la señalización canónica de Wnt (Liu et al., 2014; Purro et al., 2014). Estudios en roedores han demostrado además que la neutralización de Dkk1 disminuye los efectos neurotóxicos del péptido A β (Purro et al., 2014), y que la ausencia del co-receptor Lrp6 en un modelo de ratón APP/PS1 favorece el procesamiento amiloidogénico y la generación del péptido A β , el cual sinérgicamente inhibe la vía de Wnt y lleva a una disfunción sináptica (Liu et al., 2014). Además, en un contexto de ambiente enriquecido, Wnt7a/b favorece la sinaptogénesis (Gogolla et al., 2009).

En relación a la vía no canónica se ha descrito en cultivos de neuronas hipocampales, que la estimulación de alta frecuencia, un protocolo que induce LTP, incrementa la localización de Fz5 en la sinapsis (Sahores et al., 2010). Junto a ello, la administración icv en roedores de Wnt5a junto al péptido A β 25-35 inhibe los defectos en LTP y memoria espacial inducidos por el péptido A β 25-35 administrado aisladamente (Zhang et al., 2015). Por tanto, la activación diferentes vías de Wnt previenen los defectos asociados a las neuronas en la EA. Llama la atención que el efecto de las dos vías vaya en la misma dirección debido al balance negativo que existe entre ambas (Grumolato et al., 2010; Li et al., 2011; Yan et al., 2001) aunque podría hipotetizarse que durante la edad adulta dicha interacción se modifique.

Las Sfrps juegan un papel bloqueando los efectos de los Wnt. En este sentido, algunos estudios demuestran que la administración de Sfrp1 recombinante a través de una cánula en CA3 suprime la sinaptogénesis asociada a los estudios de ambiente enriquecido (Gogolla et al., 2009). Además, Sfrp1 y Sfrp3 evitan que los receptores Fz5 se localicen en la sinapsis ante un protocolo de estimulación de alta frecuencia (Sahores et al., 2010) y finalmente Sfrp2 inhibe los efectos inducidos por Wnt5a (Zhang et al., 2015). Estos datos contrastan con los resultados que mostramos previamente durante el desarrollo embrionario, donde Srp1 funciona como modulador positivo de la vía. Por tanto, sería interesante explorar si en la edad adulta el efecto es similar.

Resumiendo, los resultados presentados demuestran una función para Sfrp1 en la modulación del procesamiento de APP, tanto en ratones silvestres como en un modelo de EA (Fig. 29). Esta función, además de confirmar el papel de Sfrp1 como modulador negativo de ADAM10, tiene consecuencias relevantes en el comportamiento y supone importantes implicaciones en el diagnóstico y quizás tratamiento de la EA.

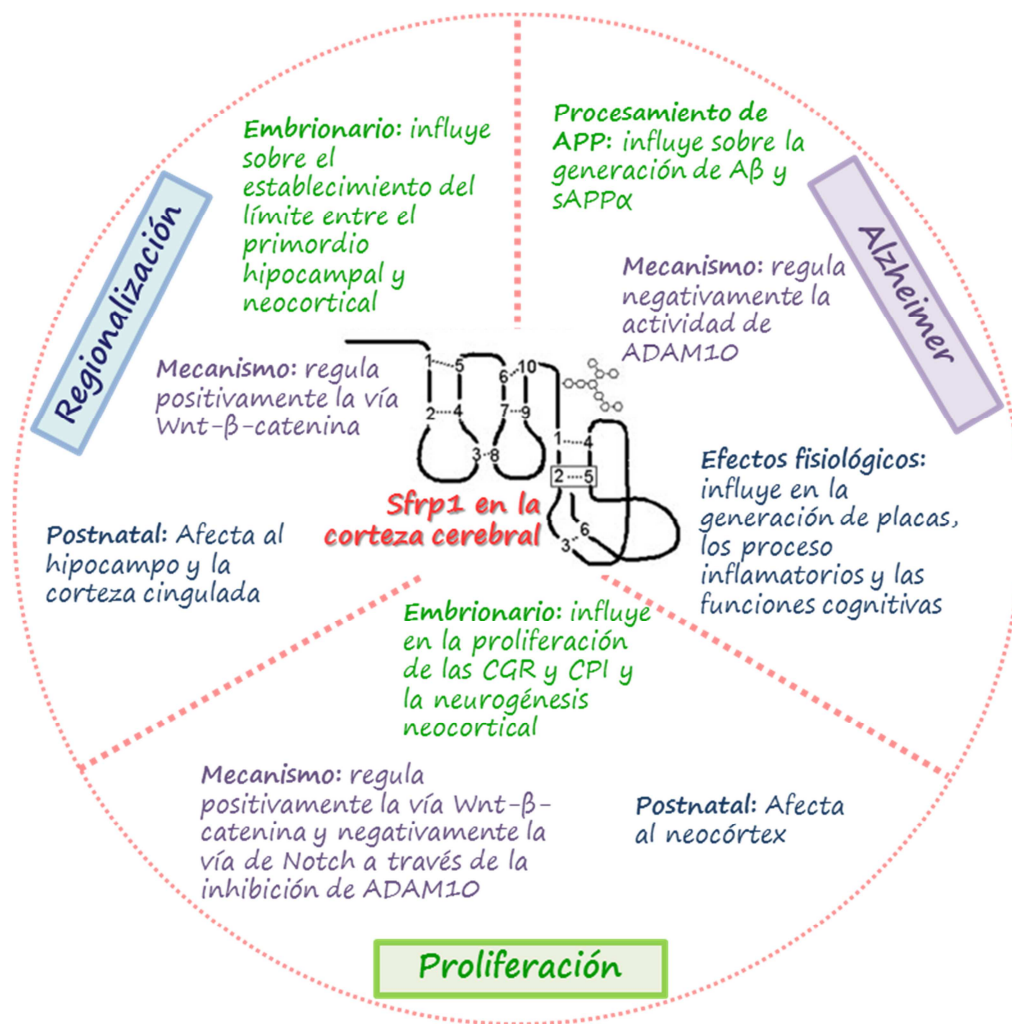


Fig. 29. Resumen del papel de Sfrp1 en la corteza cerebral durante el desarrollo embrionario (Regionalización y Proliferación) y en neurodegeneración (Enfermedad de Alzheimer). CGR célula de glía radial, CPI célula progenitora intermedia. Molécula de Sfrp1 de (Chong, et al. 2001)

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. En ratón la proteína Sfrp1 se expresa en el palio en un gradiente latero^{alto}-medial^{bajo} difundiendo desde su dominio de expresión.
2. La ausencia de Sfrp1 causa una expansión del primordio neocortical a expensas del primordio hipocampal.
3. La inactivación genética de Sfrp1 produce un incremento en el tamaño de la corteza cingulada y una disminución del hipocampo en la etapa postnatal.
4. La deficiencia de Sfrp1 incrementa el número de progenitores en el palio dorsal, promoviendo la generación de un mayor número de neuronas.
5. Sfrp es necesario para la activación de la vía Wnt/ β -catenina y la inhibición de la actividad de ADAM10.
6. La ausencia de Sfrp1 incrementa el fragmento sAPP α y reduce el péptido A β .
7. La inactivación genética de Sfrp1 previene la pérdida de memoria normalmente observada en ratones APP/PS1.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akiyama, H., S. Barger, S. Barnum, B. Bradt, J. Bauer, G.M. Cole, N.R. Cooper, P. Eikelenboom, M. Emmerling, B.L. Fiebich, C.E. Finch, S. Frautschy, W.S. Griffin, H. Hampel, M. Hull, G. Landreth, L. Lue, R. Mrak, I.R. Mackenzie, P.L. McGeer, M.K. O'Banion, J. Pachter, G. Pasinetti, C. Plata-Salaman, J. Rogers, R. Rydel, Y. Shen, W. Streit, R. Strohmeyer, I. Tooyoma, F.L. Van Muiswinkel, R. Veerhuis, D. Walker, S. Webster, B. Wegrzyniak, G. Wenk, and T. Wyss-Coray. 2000. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 21:383-421.
- Almkvist, O., H. Basun, S.L. Wagner, B.A. Rowe, L.O. Wahlund, and L. Lannfelt. 1997. Cerebrospinal fluid levels of alpha-secretase-cleaved soluble amyloid precursor protein mirror cognition in a Swedish family with Alzheimer disease and a gene mutation. *Arch Neurol*. 54:641-644.
- Amour, A., C.G. Knight, A. Webster, P.M. Slocombe, P.E. Stephens, V. Knauper, A.J. Docherty, and G. Murphy. 2000. The in vitro activity of ADAM-10 is inhibited by TIMP-1 and TIMP-3. *FEBS Lett*. 473:275-279.
- Arnold, S.J., G.J. Huang, A.F. Cheung, T. Era, S. Nishikawa, E.K. Bikoff, Z. Molnar, E.J. Robertson, and M. Groszer. 2008. The T-box transcription factor Eomes/Tbr2 regulates neurogenesis in the cortical subventricular zone. *Genes Dev*. 22:2479-2484.
- Augustine, C., J. Gunnensen, V. Spirkoska, and S.S. Tan. 2001. Place- and time-dependent expression of mouse sFRP-1 during development of the cerebral neocortex. *Mech Dev*. 109:395-397.
- Bafico, A., A. Gazit, T. Pramila, P.W. Finch, A. Yaniv, and S.A. Aaronson. 1999. Interaction of frizzled related protein (FRP) with Wnt ligands and the frizzled receptor suggests alternative mechanisms for FRP inhibition of Wnt signaling. *J Biol Chem*. 274:16180-16187.
- Bandyopadhyay, S., L.E. Goldstein, D.K. Lahiri, and J.T. Rogers. 2007. Role of the APP non-amyloidogenic signaling pathway and targeting alpha-secretase as an alternative drug target for treatment of Alzheimer's disease. *Curr Med Chem*. 14:2848-2864.
- Banyai, L., and L. Patthy. 1999. The NTR module: domains of netrins, secreted frizzled related proteins, and type I procollagen C-proteinase enhancer protein are homologous with tissue inhibitors of metalloproteases. *Protein Sci*. 8:1636-1642.
- Benilova, I., and B. De Strooper. 2011. An overlooked neurotoxic species in Alzheimer's disease. *Nat Neurosci*. 14:949-950.
- Benilova, I., E. Karran, and B. De Strooper. 2012. The toxic Abeta oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nat Neurosci*. 15:349-357.
- Bernstein, H.G., A. Bukowska, D. Krell, B. Bogerts, S. Ansorge, and U. Lendeckel. 2003. Comparative localization of ADAMs 10 and 15 in human cerebral cortex normal aging, Alzheimer disease and Down syndrome. *J Neurocytol*. 32:153-160.
- Bertram, L., C.M. Lill, and R.E. Tanzi. 2010. The genetics of Alzheimer disease: back to the future. *Neuron*. 68:270-281.
- Bijakowski, C., S. Vadon-Le Goff, F. Delolme, J.M. Bourhis, P. Lecorche, F. Ruggiero, C. Becker-Pauly, I. Yiallourous, W. Stocker, V. Dive, D.J. Hulmes, and C. Moali. 2012. Sizzled is unique among secreted frizzled-related proteins for its ability to specifically inhibit bone morphogenetic protein-1 (BMP-1)/toll-like proteinases. *J Biol Chem*. 287:33581-33593.
- Blalock, E.M., J.W. Geddes, K.C. Chen, N.M. Porter, W.R. Markesbery, and P.W. Landfield. 2004. Incipient Alzheimer's disease: microarray correlation analyses reveal major transcriptional and tumor suppressor responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:2173-2178.
- Borrell, V., and M. Gotz. 2014. Role of radial glial cells in cerebral cortex folding. *Curr Opin Neurobiol*. 27:39-46.
- Bovolenta, P., P. Esteve, J.M. Ruiz, E. Cisneros, and J. Lopez-Rios. 2008. Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. *J Cell Sci*. 121:737-746.
- Brew, K., and H. Nagase. 2010. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta*. 1803:55-71.
- Bu, G. 2009. Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Nat Rev Neurosci*. 10:333-344.
- Caille, I., B. Allinquant, E. Dupont, C. Bouillot, A. Langer, U. Muller, and A. Prochiantz. 2004. Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone. *Development*. 131:2173-2181.
- Cappello, S., A. Attardo, X. Wu, T. Iwasato, S. Itohara, M. Wilsch-Brauninger, H.M. Eilken, M.A. Rieger, T.T. Schroeder, W.B. Huttner, C. Brakebusch, and M. Gotz. 2006. The Rho-GTPase cdc42 regulates neural progenitor fate at the apical surface. *Nat Neurosci*. 9:1099-1107.
- Caronia-Brown, G., M. Yoshida, F. Gulden, S. Assimacopoulos, and E.A. Grove. 2014. The cortical hem regulates the size and patterning of neocortex. *Development*. 141:2855-2865.
- Cirrito, J.R., P.C. May, M.A. O'Dell, J.W. Taylor, M. Parsadanian, J.W. Cramer, J.E. Audia, J.S. Nissen, K.R. Bales, S.M. Paul, R.B. DeMattos, and D.M. Holtzman. 2003. In vivo assessment of brain interstitial fluid with microdialysis reveals plaque-associated changes in amyloid-beta metabolism and half-life. *J Neurosci*. 23:8844-8853.
- Cleary, J.P., D.M. Walsh, J.J. Hofmeister, G.M. Shankar, M.A. Kuskowski, D.J. Selkoe, and K.H. Ashe. 2005. Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci*. 8:79-84.

- Colciaghi, F., B. Borroni, L. Pastorino, E. Marcello, M. Zimmermann, F. Cattabeni, A. Padovani, and M. Di Luca. 2002. [alpha]-Secretase ADAM10 as well as [alpha]APPs is reduced in platelets and CSF of Alzheimer disease patients. *Mol Med.* 8:67-74.
- Cubelos, B., A. Sebastian-Serrano, S. Kim, C. Moreno-Ortiz, J.M. Redondo, C.A. Walsh, and M. Nieto. 2008. Cux-2 controls the proliferation of neuronal intermediate precursors of the cortical subventricular zone. *Cereb Cortex.* 18:1758-1770.
- Chen, Y., and A.M. Bodles. 2007. Amyloid precursor protein modulates beta-catenin degradation. *J Neuroinflammation.* 4:29.
- Chenn, A., and C.A. Walsh. 2002. Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors. *Science.* 297:365-369.
- Chong, J.M., A. Uren, J.S. Rubin, and D.W. Speicher. 2002. Disulfide bond assignments of secreted Frizzled-related protein-1 provide insights about Frizzled homology and netrin modules. *J Biol Chem.* 277:5134-5144.
- Chou, S.J., and D.D. O'Leary. 2013. Role for Lhx2 in corticogenesis through regulation of progenitor differentiation. *Mol Cell Neurosci.* 56:1-9.
- D'Souza, B., A. Miyamoto, and G. Weinmaster. 2008. The many facets of Notch ligands. *Oncogene.* 27:5148-5167.
- Dann, C.E., J.C. Hsieh, A. Rattner, D. Sharma, J. Nathans, and D.J. Leahy. 2001. Insights into Wnt binding and signalling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains. *Nature.* 412:86-90.
- Dave, R.K., T. Ellis, M.C. Toumpas, J.P. Robson, E. Julian, C. Adolphe, P.F. Bartlett, H.M. Cooper, B.A. Reynolds, and B.J. Wainwright. 2011. Sonic hedgehog and notch signaling can cooperate to regulate neurogenic divisions of neocortical progenitors. *PLoS One.* 6:e14680.
- Del Bene, F., A.M. Wehman, B.A. Link, and H. Baier. 2008. Regulation of neurogenesis by interkinetic nuclear migration through an apical-basal notch gradient. *Cell.* 134:1055-1065.
- Desai, A.R., and S.K. McConnell. 2000. Progressive restriction in fate potential by neural progenitors during cerebral cortical development. *Development.* 127:2863-2872.
- Douglas, R.J., and K.A. Martin. 2004. Neuronal circuits of the neocortex. *Annu Rev Neurosci.* 27:419-451.
- Eckler, M.J., T.D. Nguyen, W.L. McKenna, B.L. Fastow, C. Guo, J.L. Rubenstein, and B. Chen. 2015. Cux2-positive radial glial cells generate diverse subtypes of neocortical projection neurons and macroglia. *Neuron.* 86:1100-1108.
- Elsen, G.E., R.D. Hodge, F. Bedogni, R.A. Daza, B.R. Nelson, N. Shiba, S.L. Reiner, and R.F. Hevner. 2013. The protomap is propagated to cortical plate neurons through an Eomes-dependent intermediate map. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110:4081-4086.
- Englund, C., A. Fink, C. Lau, D. Pham, R.A. Daza, A. Bulfone, T. Kowalczyk, and R.F. Hevner. 2005. Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex. *J Neurosci.* 25:247-251.
- Epis, R., E. Marcello, F. Gardoni, C. Vastagh, M. Malinverno, C. Balducci, A. Colombo, B. Borroni, H. Vara, M. Dell'Agli, F. Cattabeni, M. Giustetto, T. Borsello, G. Forloni, A. Padovani, and M. Di Luca. 2010. Blocking ADAM10 synaptic trafficking generates a model of sporadic Alzheimer's disease. *Brain.* 133:3323-3335.
- Espargaro, A., R. Sabate, and S. Ventura. 2012. Thioflavin-S staining coupled to flow cytometry. A screening tool to detect in vivo protein aggregation. *Mol Biosyst.* 8:2839-2844.
- Esteve, P., and P. Bovolenta. 2010. The advantages and disadvantages of sfrp1 and sfrp2 expression in pathological events. *Tohoku J Exp Med.* 221:11-17.
- Esteve, P., J. Lopez-Rios, and P. Bovolenta. 2004. SFRP1 is required for the proper establishment of the eye field in the medaka fish. *Mech Dev.* 121:687-701.
- Esteve, P., J. Morcillo, and P. Bovolenta. 2000. Early and dynamic expression of cSfrp1 during chick embryo development. *Mech Dev.* 97:217-221.
- Esteve, P., A. Sandonis, M. Cardozo, J. Malapeira, C. Ibanez, I. Crespo, S. Marcos, S. Gonzalez-Garcia, M.L. Toribio, J. Arribas, A. Shimono, I. Guerrero, and P. Bovolenta. 2011a. SFRPs act as negative modulators of ADAM10 to regulate retinal neurogenesis. *Nat Neurosci.* 14:562-569.
- Esteve, P., A. Sandonis, C. Ibanez, A. Shimono, I. Guerrero, and P. Bovolenta. 2011b. Secreted frizzled-related proteins are required for Wnt/beta-catenin signalling activation in the vertebrate optic cup. *Development.* 138:4179-4184.
- Fellgiebel, A., E. Kojro, M.J. Muller, A. Scheurich, L.G. Schmidt, and F. Fahrenholz. 2009. CSF APPs alpha and phosphorylated tau protein levels in mild cognitive impairment and dementia of Alzheimer's type. *J Geriatr Psychiatry Neurol.* 22:3-9.
- Finch, P.W., X. He, M.J. Kelley, A. Uren, R.P. Schaudies, N.C. Popescu, S. Rudikoff, S.A. Aaronson, H.E. Varmus, and J.S. Rubin. 1997. Purification and molecular cloning of a secreted, Frizzled-related antagonist of Wnt action. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:6770-6775.
- Florio, M., and W.B. Huttner. 2014. Neural progenitors, neurogenesis and the evolution of the neocortex. *Development.* 141:2182-2194.
- Franco, S.J., C. Gil-Sanz, I. Martinez-Garay, A. Espinosa, S.R. Harkins-Perry, C. Ramos, and U. Muller. 2012. Fate-restricted neural progenitors in the mammalian cerebral cortex. *Science.* 337:746-749.
- Furukawa, K., B.L. Sopher, R.E. Rydel, J.G. Begley, D.G. Pham, G.M. Martin, M. Fox, and M.P. Mattson. 1996. Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of alpha-secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain. *J Neurochem.* 67:1882-1896.

- Furuta, Y., D.W. Piston, and B.L. Hogan. 1997. Bone morphogenetic proteins (BMPs) as regulators of dorsal forebrain development. *Development*. 124:2203-2212.
- Gaiano, N., and G. Fishell. 2002. The role of notch in promoting glial and neural stem cell fates. *Annu Rev Neurosci*. 25:471-490.
- Gaiano, N., J.S. Nye, and G. Fishell. 2000. Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain. *Neuron*. 26:395-404.
- Gal, J.S., Y.M. Morozov, A.E. Ayoub, M. Chatterjee, P. Rakic, and T.F. Haydar. 2006. Molecular and morphological heterogeneity of neural precursors in the mouse neocortical proliferative zones. *J Neurosci*. 26:1045-1056.
- Galceran, J., E.M. Miyashita-Lin, E. Devaney, J.L. Rubenstein, and R. Grosschedl. 2000. Hippocampus development and generation of dentate gyrus granule cells is regulated by LEF1. *Development*. 127:469-482.
- Gao, F., Q. Zhang, M.H. Zheng, H.L. Liu, Y.Y. Hu, P. Zhang, Z.P. Zhang, H.Y. Qin, L. Feng, L. Wang, H. Han, and G. Ju. 2009. Transcription factor RBP-J-mediated signaling represses the differentiation of neural stem cells into intermediate neural progenitors. *Mol Cell Neurosci*. 40:442-450.
- Garcia-Alloza, M., E.M. Robbins, S.X. Zhang-Nunes, S.M. Purcell, R.A. Betensky, S. Raju, C. Prada, S.M. Greenberg, B.J. Bacskai, and M.P. Frosch. 2006. Characterization of amyloid deposition in the APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer disease. *Neurobiol Dis*. 24:516-524.
- Garcia-Hoyos, M., D. Cantalapiedra, C. Arroyo, P. Esteve, J. Rodriguez, R. Riveiro, M.J. Trujillo, C. Ramos, P. Bovolenta, and C. Ayuso. 2004. Evaluation of SFRP1 as a candidate for human retinal dystrophies. *Mol Vis*. 10:426-431.
- Gatz, M., C.A. Reynolds, L. Fratiglioni, B. Johansson, J.A. Mortimer, S. Berg, A. Fiske, and N.L. Pedersen. 2006. Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. *Arch Gen Psychiatry*. 63:168-174.
- Gaur, T., L. Rich, C.J. Lengner, S. Hussain, B. Trevant, D. Ayers, J.L. Stein, P.V. Bodine, B.S. Komm, G.S. Stein, and J.B. Lian. 2006. Secreted frizzled related protein 1 regulates Wnt signaling for BMP2 induced chondrocyte differentiation. *J Cell Physiol*. 208:87-96.
- Glenner, G.G., and C.W. Wong. 1984. Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 122:1131-1135.
- Godbolt, A.K., J.A. Beck, J. Collinge, P. Garrard, J.D. Warren, N.C. Fox, and M.N. Rossor. 2004. A presenilin 1 R278I mutation presenting with language impairment. *Neurology*. 63:1702-1704.
- Gogolla, N., I. Galimberti, Y. Deguchi, and P. Caroni. 2009. Wnt signaling mediates experience-related regulation of synapse numbers and mossy fiber connectivities in the adult hippocampus. *Neuron*. 62:510-525.
- Gong, Y., L. Chang, K.L. Viola, P.N. Lacor, M.P. Lambert, C.E. Finch, G.A. Krafft, and W.L. Klein. 2003. Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:10417-10422.
- Gotz, M., and L. Sommer. 2005. Cortical development: the art of generating cell diversity. *Development*. 132:3327-3332.
- Gralle, M., and S.T. Ferreira. 2007. Structure and functions of the human amyloid precursor protein: the whole is more than the sum of its parts. *Prog Neurobiol*. 82:11-32.
- Greig, L.C., M.B. Woodworth, M.J. Galazo, H. Padmanabhan, and J.D. Macklis. 2013. Molecular logic of neocortical projection neuron specification, development and diversity. *Nat Rev Neurosci*. 14:755-769.
- Grove, E.A., S. Tole, J. Limon, L. Yip, and C.W. Ragsdale. 1998. The hem of the embryonic cerebral cortex is defined by the expression of multiple Wnt genes and is compromised in Gli3-deficient mice. *Development*. 125:2315-2325.
- Grumolato, L., G. Liu, P. Mong, R. Mudbhary, R. Biswas, R. Arroyave, S. Vijayakumar, A.N. Economides, and S.A. Aaronson. 2010. Canonical and noncanonical Wnts use a common mechanism to activate completely unrelated coreceptors. *Genes Dev*. 24:2517-2530.
- Guo, C., M.J. Eckler, W.L. McKenna, G.L. McKinsey, J.L. Rubenstein, and B. Chen. 2013. Fezf2 expression identifies a multipotent progenitor for neocortical projection neurons, astrocytes, and oligodendrocytes. *Neuron*. 80:1167-1174.
- Haass, C., A.Y. Hung, M.G. Schlossmacher, D.B. Teplow, and D.J. Selkoe. 1993. beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. *J Biol Chem*. 268:3021-3024.
- Haass, C., C.A. Lemere, A. Capell, M. Citron, P. Seubert, D. Schenk, L. Lannfelt, and D.J. Selkoe. 1995. The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway. *Nat Med*. 1:1291-1296.
- Haass, C., and D.J. Selkoe. 2007. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8:101-112.
- Hardy, J., and D.J. Selkoe. 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. 297:353-356.
- Harrison-Uy, S.J., and S.J. Pleasure. 2012. Wnt signaling and forebrain development. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 4:a008094.
- Hartmann, D., B. de Strooper, L. Serneels, K. Craessaerts, A. Herreman, W. Annaert, L. Umans, T. Lubke, A. Lena Illert, K. von Figura, and P. Saftig. 2002. The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Hum Mol Genet*. 11:2615-2624.
- Hatakeyama, J., Y. Bessho, K. Katoh, S. Ookawara, M. Fujioka, F. Guillemot, and R. Kageyama. 2004. Hes genes regulate size, shape and histogenesis of the nervous system by control of the timing of neural stem cell differentiation. *Development*. 131:5539-5550.

- Hatakeyama, J., and R. Kageyama. 2006. Notch1 expression is spatiotemporally correlated with neurogenesis and negatively regulated by Notch1-independent Hes genes in the developing nervous system. *Cereb Cortex*. 16 Suppl 1:i132-137.
- Hausler, K.D., N.J. Horwood, Y. Chuman, J.L. Fisher, J. Ellis, T.J. Martin, J.S. Rubin, and M.T. Gillespie. 2004. Secreted frizzled-related protein-1 inhibits RANKL-dependent osteoclast formation. *J Bone Miner Res*. 19:1873-1881.
- Hebert, J.M., and G. Fishell. 2008. The genetics of early telencephalon patterning: some assembly required. *Nat Rev Neurosci*. 9:678-685.
- Herrup, K. 2015. The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis. *Nat Neurosci*. 18:794-799.
- Hirabayashi, Y., Y. Itoh, H. Tabata, K. Nakajima, T. Akiyama, N. Masuyama, and Y. Gotoh. 2004. The Wnt/beta-catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells. *Development*. 131:2791-2801.
- Hoe, H.S., M.J. Cooper, M.P. Burns, P.A. Lewis, M. van der Brug, G. Chakraborty, C.M. Cartagena, D.T. Pak, M.R. Cookson, and G.W. Rebeck. 2007. The metalloprotease inhibitor TIMP-3 regulates amyloid precursor protein and apolipoprotein E receptor proteolysis. *J Neurosci*. 27:10895-10905.
- Holly, V.L., S.A. Widen, J.K. Famulski, and A.J. Waskiewicz. 2014. Sfrp1a and Sfrp5 function as positive regulators of Wnt and BMP signaling during early retinal development. *Dev Biol*. 388:192-204.
- Huang, Z.J. 2014. Toward a genetic dissection of cortical circuits in the mouse. *Neuron*. 83:1284-1302.
- Iizuka, T., M. Shoji, Y. Harigaya, T. Kawarabayashi, M. Watanabe, M. Kanai, and S. Hirai. 1995. Amyloid beta-protein ending at Thr43 is a minor component of some diffuse plaques in the Alzheimer's disease brain, but is not found in cerebrovascular amyloid. *Brain Res*. 702:275-278.
- Imayoshi, I., T. Shimogori, T. Ohtsuka, and R. Kageyama. 2008. Hes genes and neurogenin regulate non-neural versus neural fate specification in the dorsal telencephalic midline. *Development*. 135:2531-2541.
- Ingram, W.J., K.I. McCue, T.H. Tran, A.R. Hallahan, and B.J. Wainwright. 2008. Sonic Hedgehog regulates Hes1 through a novel mechanism that is independent of canonical Notch pathway signalling. *Oncogene*. 27:1489-1500.
- Ishibashi, M., S.L. Ang, K. Shiota, S. Nakanishi, R. Kageyama, and F. Guillemot. 1995. Targeted disruption of mammalian hairy and Enhancer of split homolog-1 (HES-1) leads to up-regulation of neural helix-loop-helix factors, premature neurogenesis, and severe neural tube defects. *Genes Dev*. 9:3136-3148.
- Ishida, A., K. Furukawa, J.N. Keller, and M.P. Mattson. 1997. Secreted form of beta-amyloid precursor protein shifts the frequency dependency for induction of LTD, and enhances LTP in hippocampal slices. *Neuroreport*. 8:2133-2137.
- Jankowsky, J.L., D.J. Fadale, J. Anderson, G.M. Xu, V. Gonzales, N.A. Jenkins, N.G. Copeland, M.K. Lee, L.H. Younkin, S.L. Wagner, S.G. Younkin, and D.R. Borchelt. 2004a. Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase. *Hum Mol Genet*. 13:159-170.
- Jankowsky, J.L., H.H. Slunt, V. Gonzales, N.A. Jenkins, N.G. Copeland, and D.R. Borchelt. 2004b. APP processing and amyloid deposition in mice haplo-insufficient for presenilin 1. *Neurobiol Aging*. 25:885-892.
- Jankowsky, J.L., H.H. Slunt, T. Ratovitski, N.A. Jenkins, N.G. Copeland, and D.R. Borchelt. 2001. Co-expression of multiple transgenes in mouse CNS: a comparison of strategies. *Biomol Eng*. 17:157-165.
- Jin, M., N. Shepardson, T. Yang, G. Chen, D. Walsh, and D.J. Selkoe. 2011. Soluble amyloid beta-protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108:5819-5824.
- Johnson, K.A., N.C. Fox, R.A. Sperling, and W.E. Klunk. 2012. Brain imaging in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2:a006213.
- Jorissen, E., J. Prox, C. Bernreuther, S. Weber, R. Schwanbeck, L. Serneels, A. Snellinx, K. Craessaerts, A. Thathiah, I. Teseur, U. Bartsch, G. Weskamp, C.P. Blobel, M. Glatzel, B. De Strooper, and P. Saftig. 2010. The disintegrin/metalloproteinase ADAM10 is essential for the establishment of the brain cortex. *J Neurosci*. 30:4833-4844.
- Junghans, D., I. Hack, M. Frotscher, V. Taylor, and R. Kemler. 2005. Beta-catenin-mediated cell-adhesion is vital for embryonic forebrain development. *Dev Dyn*. 233:528-539.
- Kageyama, R., T. Ohtsuka, and T. Kobayashi. 2008a. Roles of Hes genes in neural development. *Dev Growth Differ*. 50 Suppl 1:S97-103.
- Kageyama, R., T. Ohtsuka, H. Shimojo, and I. Imayoshi. 2008b. Dynamic Notch signaling in neural progenitor cells and a revised view of lateral inhibition. *Nat Neurosci*. 11:1247-1251.
- Kamenetz, F., T. Tomita, H. Hsieh, G. Seabrook, D. Borchelt, T. Iwatsubo, S. Sisodia, and R. Malinow. 2003. APP processing and synaptic function. *Neuron*. 37:925-937.
- Karow, D.S., L.K. McEvoy, C. Fennema-Notestine, D.J. Hagler, Jr., R.G. Jennings, J.B. Brewer, C.K. Hoh, and A.M. Dale. 2010. Relative capability of MR imaging and FDG PET to depict changes associated with prodromal and early Alzheimer disease. *Radiology*. 256:932-942.
- Katoh, Y., and M. Katoh. 2005. Comparative genomics on SFRP1 orthologs. *Int J Oncol*. 27:861-865.
- Kele, J., E.R. Andersson, J.C. Villaescusa, L. Cajanek, C.L. Parish, S. Bonilla, E.M. Toledo, V. Bryja, J.S. Rubin, A. Shimon, and E. Arenas. 2012. SFRP1 and SFRP2 dose-dependently regulate midbrain dopamine neuron development in vivo and in embryonic stem cells. *Stem Cells*. 30:865-875.

- Keller, L., H. Welander, H.H. Chiang, L.O. Tjernberg, I. Nennesmo, A.K. Wallin, and C. Graff. 2010. The PSEN1 I143T mutation in a Swedish family with Alzheimer's disease: clinical report and quantification of Abeta in different brain regions. *Eur J Hum Genet.* 18:1202-1208.
- Kim, A.S., D.H. Lowenstein, and S.J. Pleasure. 2001. Wnt receptors and Wnt inhibitors are expressed in gradients in the developing telencephalon. *Mech Dev.* 103:167-172.
- Kim, M., J. Suh, D. Romano, M.H. Truong, K. Mullin, B. Hooli, D. Norton, G. Tesco, K. Elliott, S.L. Wagner, R.D. Moir, K.D. Becker, and R.E. Tanzi. 2009. Potential late-onset Alzheimer's disease-associated mutations in the ADAM10 gene attenuate α -secretase activity. *Hum Mol Genet.* 18:3987-3996.
- Kim, M.L., B. Zhang, I.P. Mills, M.E. Milla, K.R. Brunden, and V.M. Lee. 2008. Effects of TNF α -converting enzyme inhibition on amyloid beta production and APP processing in vitro and in vivo. *J Neurosci.* 28:12052-12061.
- Klyubin, I., D.M. Walsh, C.A. Lemere, W.K. Cullen, G.M. Shankar, V. Betts, E.T. Spooner, L. Jiang, R. Anwyl, D.J. Selkoe, and M.J. Rowan. 2005. Amyloid beta protein immunotherapy neutralizes Abeta oligomers that disrupt synaptic plasticity in vivo. *Nat Med.* 11:556-561.
- Kojro, E., G. Gimpl, S. Lammich, W. Marz, and F. Fahrenholz. 2001. Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the α -secretase ADAM 10. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:5815-5820.
- Koo, E.H., and S.L. Squazzo. 1994. Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. *J Biol Chem.* 269:17386-17389.
- Kopan, R., and M.X. Ilagan. 2009. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell.* 137:216-233.
- Kosodo, Y., and W.B. Huttner. 2009. Basal process and cell divisions of neural progenitors in the developing brain. *Dev Growth Differ.* 51:251-261.
- Kriegstein, A., and A. Alvarez-Buylla. 2009. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci.* 32:149-184.
- Kuhn, P.H., H. Wang, B. Dislich, A. Colombo, U. Zeitschel, J.W. Ellwart, E. Kremmer, S. Rossner, and S.F. Lichtenthaler. 2010. ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive α -secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J.* 29:3020-3032.
- Kuwahara, A., Y. Hirabayashi, P.S. Knoepfler, M.M. Taketo, J. Sakai, T. Kodama, and Y. Gotoh. 2010. Wnt signaling and its downstream target N-myc regulate basal progenitors in the developing neocortex. *Development.* 137:1035-1044.
- Leclerc, L., and F. Rentzsch. 2012. Repeated evolution of identical domain architecture in metazoan netrin domain-containing proteins. *Genome Biol Evol.* 4:883-899.
- Lee, H.X., A.L. Ambrosio, B. Reversade, and E.M. De Robertis. 2006. Embryonic dorsal-ventral signaling: secreted frizzled-related proteins as inhibitors of tolloid proteinases. *Cell.* 124:147-159.
- Lee, S.M., S. Tole, E. Grove, and A.P. McMahon. 2000. A local Wnt-3a signal is required for development of the mammalian hippocampus. *Development.* 127:457-467.
- Leissring, M.A. 2008. The AbetaCs of Abeta-cleaving proteases. *J Biol Chem.* 283:29645-29649.
- Leyns, L., T. Bouwmeester, S.H. Kim, S. Piccolo, and E.M. De Robertis. 1997. Frzb-1 is a secreted antagonist of Wnt signaling expressed in the Spemann organizer. *Cell.* 88:747-756.
- Li, R., K. Lindholm, L.B. Yang, X. Yue, M. Citron, R. Yan, T. Beach, L. Sue, M. Sabbagh, H. Cai, P. Wong, D. Price, and Y. Shen. 2004. Amyloid beta peptide load is correlated with increased beta-secretase activity in sporadic Alzheimer's disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:3632-3637.
- Li, S., R. Esterberg, V. Lachance, D. Ren, K. Radde-Gallwitz, F. Chi, J.L. Parent, A. Fritz, and P. Chen. 2011. Rack1 is required for Vangl2 membrane localization and planar cell polarity signaling while attenuating canonical Wnt activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108:2264-2269.
- Lichtenthaler, S.F. 2011. α -secretase in Alzheimer's disease: molecular identity, regulation and therapeutic potential. *J Neurochem.* 116:10-21.
- Liu, C.C., C.W. Tsai, F. Deak, J. Rogers, M. Penuliar, Y.M. Sung, J.N. Maher, Y. Fu, X. Li, H. Xu, S. Estus, H.S. Hoe, J.D. Fryer, T. Kanekiyo, and G. Bu. 2014. Deficiency in LRP6-mediated Wnt signaling contributes to synaptic abnormalities and amyloid pathology in Alzheimer's disease. *Neuron.* 84:63-77.
- Lopez-Rios, J., P. Esteve, J.M. Ruiz, and P. Bovolenta. 2008. The Netrin-related domain of Sfrp1 interacts with Wnt ligands and antagonizes their activity in the anterior neural plate. *Neural Dev.* 3:19.
- Lui, J.H., D.V. Hansen, and A.R. Kriegstein. 2011. Development and evolution of the human neocortex. *Cell.* 146:18-36.
- Lui, J.H., T.J. Nowakowski, A.A. Pollen, A. Javaherian, A.R. Kriegstein, and M.C. Oldham. 2014. Radial glia require PDGFR β -PDGFR β signalling in human but not mouse neocortex. *Nature.* 515:264-268.
- MacDonald, B.T., K. Tamai, and X. He. 2009. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell.* 17:9-26.
- Machon, O., M. Backman, O. Machonova, Z. Kozmik, T. Vacik, L. Andersen, and S. Krauss. 2007. A dynamic gradient of Wnt signaling controls initiation of neurogenesis in the mammalian cortex and cellular specification in the hippocampus. *Dev Biol.* 311:223-237.
- Mangale, V.S., K.E. Hirokawa, P.R. Satyaki, N. Gokulchandran, S. Chikbire, L. Subramanian, A.S. Shetty, B. Martynoga, J. Paul, M.V. Mai, Y. Li, L.A. Flanagan, S. Tole, and E.S. Monuki. 2008. Lhx2 selector activity specifies cortical identity and suppresses hippocampal organizer fate. *Science.* 319:304-309.

- Marcinkiewicz, M., and N.G. Seidah. 2000. Coordinated expression of beta-amyloid precursor protein and the putative beta-secretase BACE and alpha-secretase ADAM10 in mouse and human brain. *J Neurochem.* 75:2133-2143.
- Marcos, S., F. Nieto-Lopez, A. Sandonis, M.J. Cardozo, F. Di Marco, P. Esteve, and P. Bovolenta. 2015. Secreted frizzled related proteins modulate pathfinding and fasciculation of mouse retina ganglion cell axons by direct and indirect mechanisms. *J Neurosci.* 35:4729-4740.
- Maretto, S., M. Cordenonsi, S. Dupont, P. Braghetta, V. Broccoli, A.B. Hassan, D. Volpin, G.M. Bressan, and S. Piccolo. 2003. Mapping Wnt/beta-catenin signaling during mouse development and in colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:3299-3304.
- Marin, O., and J.L. Rubenstein. 2001. A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat Rev Neurosci.* 2:780-790.
- Marin, O., M. Valiente, X. Ge, and L.H. Tsai. 2010. Guiding neuronal cell migrations. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2:a001834.
- Martin-Manso, G., M.J. Calzada, Y. Chuman, J.M. Sipes, C.P. Xavier, V. Wolf, S.A. Kuznetsova, J.S. Rubin, and D.D. Roberts. 2011. sFRP-1 binds via its netrin-related motif to the N-module of thrombospondin-1 and blocks thrombospondin-1 stimulation of MDA-MB-231 breast carcinoma cell adhesion and migration. *Arch Biochem Biophys.* 509:147-156.
- Martynoga, B., D. Drechsel, and F. Guillemot. 2012. Molecular control of neurogenesis: a view from the mammalian cerebral cortex. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 4.
- Mathis, C.A., B.J. Bacskai, S.T. Kajdasz, M.E. McLellan, M.P. Frosch, B.T. Hyman, D.P. Holt, Y. Wang, G.F. Huang, M.L. Debnath, and W.E. Klunk. 2002. A lipophilic thioflavin-T derivative for positron emission tomography (PET) imaging of amyloid in brain. *Bioorg Med Chem Lett.* 12:295-298.
- Matsuyama, M., S. Aizawa, and A. Shimono. 2009. Sfrp controls apicobasal polarity and oriented cell division in developing gut epithelium. *PLoS Genet.* 5:e1000427.
- Mattson, M.P. 1997. Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol Rev.* 77:1081-1132.
- Mattson, M.P., B. Cheng, A.R. Culwell, F.S. Esch, I. Lieberburg, and R.E. Rydel. 1993. Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein. *Neuron.* 10:243-254.
- McLean, C.A., R.A. Cherny, F.W. Fraser, S.J. Fuller, M.J. Smith, K. Beyreuther, A.I. Bush, and C.L. Masters. 1999. Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 46:860-866.
- Melkonyan, H.S., W.C. Chang, J.P. Shapiro, M. Mahadevappa, P.A. Fitzpatrick, M.C. Kiefer, L.D. Tomei, and S.R. Umansky. 1997. SARPs: a family of secreted apoptosis-related proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:13636-13641.
- Meyer-Luehmann, M., T.L. Spires-Jones, C. Prada, M. Garcia-Alloza, A. de Calignon, A. Rozkalne, J. Koenigsknecht-Talboo, D.M. Holtzman, B.J. Bacskai, and B.T. Hyman. 2008. Rapid appearance and local toxicity of amyloid-beta plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature.* 451:720-724.
- Meziane, H., J.C. Dodart, C. Mathis, S. Little, J. Clemens, S.M. Paul, and A. Ungerer. 1998. Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnesic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:12683-12688.
- Mii, Y., and M. Taira. 2009. Secreted Frizzled-related proteins enhance the diffusion of Wnt ligands and expand their signalling range. *Development.* 136:4083-4088.
- Mizutani, K., K. Yoon, L. Dang, A. Tokunaga, and N. Gaiano. 2007. Differential Notch signalling distinguishes neural stem cells from intermediate progenitors. *Nature.* 449:351-355.
- Moechars, D., K. Lorent, B. De Strooper, I. Dewachter, and F. Van Leuven. 1996. Expression in brain of amyloid precursor protein mutated in the alpha-secretase site causes disturbed behavior, neuronal degeneration and premature death in transgenic mice. *EMBO J.* 15:1265-1274.
- Molyneaux, B.J., P. Arlotta, J.R. Menezes, and J.D. Macklis. 2007. Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci.* 8:427-437.
- Mountcastle, V.B. 1997. The columnar organization of the neocortex. *Brain.* 120 (Pt 4):701-722.
- Munji, R.N., Y. Choe, G. Li, J.A. Siegenthaler, and S.J. Pleasure. 2011. Wnt signaling regulates neuronal differentiation of cortical intermediate progenitors. *J Neurosci.* 31:1676-1687.
- Muraguchi, T., Y. Takegami, T. Ohtsuka, S. Kitajima, E.P. Chandana, A. Omura, T. Miki, R. Takahashi, N. Matsumoto, A. Ludwig, M. Noda, and C. Takahashi. 2007. RECK modulates Notch signaling during cortical neurogenesis by regulating ADAM10 activity. *Nat Neurosci.* 10:838-845.
- Murphy, G. 2011. Tissue inhibitors of metalloproteinases. *Genome Biol.* 12:233.
- Murphy, G., A. Murthy, and R. Khokha. 2008. Clipping, shedding and RIPping keep immunity on cue. *Trends Immunol.* 29:75-82.
- Musiek, E.S., and D.M. Holtzman. 2015. Three dimensions of the amyloid hypothesis: time, space and 'wingmen'. *Nat Neurosci.* 18:800-806.
- Mutch, C.A., J.D. Schulte, E. Olson, and A. Chenn. 2010. Beta-catenin signaling negatively regulates intermediate progenitor population numbers in the developing cortex. *PLoS One.* 5:e12376.
- Muzio, L., and A. Mallamaci. 2005. Foxg1 confines Cajal-Retzius neuronogenesis and hippocampal morphogenesis to the dorsomedial pallium. *J Neurosci.* 25:4435-4441.

- Nakamura, Y., S. Sakakibara, T. Miyata, M. Ogawa, T. Shimazaki, S. Weiss, R. Kageyama, and H. Okano. 2000. The bHLH gene *hes1* as a repressor of the neuronal commitment of CNS stem cells. *J Neurosci.* 20:283-293.
- Nelson, B.R., R.D. Hodge, F. Bedogni, and R.F. Hevner. 2013. Dynamic interactions between intermediate neurogenic progenitors and radial glia in embryonic mouse neocortex: potential role in Dll1-Notch signaling. *J Neurosci.* 33:9122-9139.
- Nicolas, M., and B.A. Hassan. 2014. Amyloid precursor protein and neural development. *Development.* 141:2543-2548.
- Nieto, M., E.S. Monuki, H. Tang, J. Imitola, N. Haubst, S.J. Khoury, J. Cunningham, M. Gotz, and C.A. Walsh. 2004. Expression of *Cux-1* and *Cux-2* in the subventricular zone and upper layers II-IV of the cerebral cortex. *J Comp Neurol.* 479:168-180.
- Nikolaev, A., T. McLaughlin, D.D. O'Leary, and M. Tessier-Lavigne. 2009. APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature.* 457:981-989.
- Noctor, S.C., V. Martinez-Cerdeno, L. Ivic, and A.R. Kriegstein. 2004. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci.* 7:136-144.
- Nonaka-Kinoshita, M., I. Reillo, B. Artegiani, M.A. Martinez-Martinez, M. Nelson, V. Borrell, and F. Calegari. 2013. Regulation of cerebral cortex size and folding by expansion of basal progenitors. *EMBO J.* 32:1817-1828.
- Obregon, D., H. Hou, J. Deng, B. Giunta, J. Tian, D. Darlington, M. Shahaduzzaman, Y. Zhu, T. Mori, M.P. Mattson, and J. Tan. 2012. Soluble amyloid precursor protein- α modulates beta-secretase activity and amyloid-beta generation. *Nat Commun.* 3:777.
- Ochiai, W., S. Nakatani, T. Takahara, M. Kainuma, M. Masaoka, S. Minobe, M. Namihira, K. Nakashima, A. Sakakibara, M. Ogawa, and T. Miyata. 2009. Periventricular notch activation and asymmetric *Ngn2* and *Tbr2* expression in pair-generated neocortical daughter cells. *Mol Cell Neurosci.* 40:225-233.
- Ogata, T., T. Ueno, S. Hoshikawa, J. Ito, R. Okazaki, K. Hayakawa, K. Morioka, S. Yamamoto, K. Nakamura, S. Tanaka, and M. Akai. 2011. *Hes1* functions downstream of growth factors to maintain oligodendrocyte lineage cells in the early progenitor stage. *Neuroscience.* 176:132-141.
- Ohata, S., R. Aoki, S. Kinoshita, M. Yamaguchi, S. Tsuruoka-Kinoshita, H. Tanaka, H. Wada, S. Watabe, T. Tsuboi, I. Masai, and H. Okamoto. 2011. Dual roles of Notch in regulation of apically restricted mitosis and apicobasal polarity of neuroepithelial cells. *Neuron.* 69:215-230.
- Ohtsuka, T., M. Ishibashi, G. Gradwohl, S. Nakanishi, F. Guillemot, and R. Kageyama. 1999. *Hes1* and *Hes5* as notch effectors in mammalian neuronal differentiation. *EMBO J.* 18:2196-2207.
- Ohtsuka, T., M. Sakamoto, F. Guillemot, and R. Kageyama. 2001. Roles of the basic helix-loop-helix genes *Hes1* and *Hes5* in expansion of neural stem cells of the developing brain. *J Biol Chem.* 276:30467-30474.
- Oldefest, M., S. Dusterhoft, C. Desel, S. Thysen, C. Fink, B. Rabe, R. Lories, J. Grotzinger, and I. Lorenzen. 2015. Secreted Frizzled-related protein 3 (sFRP3)-mediated suppression of Interleukin-6 receptor release by A disintegrin and Metalloprotease 17 (ADAM17) is abrogated in the osteoarthritis-associated rare double variant of sFRP3. *Biochem J.* 468 (3) 507-18.
- Palop, J.J., and L. Mucke. 2010. Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nat Neurosci.* 13:812-818.
- Papachristou, P., C. Dyberg, M. Lindqvist, Z. Horn, and T. Ringstedt. 2014. Transgenic increase of *Wnt7b* in neural progenitor cells decreases expression of T-domain transcription factors and impairs neuronal differentiation. *Brain Res.* 1576:27-34.
- Papaioannou, V.E. 2014. The T-box gene family: emerging roles in development, stem cells and cancer. *Development.* 141:3819-3833.
- Parvathy, S., P. Davies, V. Haroutunian, D.P. Purohit, K.L. Davis, R.C. Mohs, H. Park, T.M. Moran, J.Y. Chan, and J.D. Buxbaum. 2001. Correlation between Abeta₄₀-, Abeta₄₂-, and Abeta₄₃-containing amyloid plaques and cognitive decline. *Arch Neurol.* 58:2025-2032.
- Pham, E., L. Crews, K. Ubhi, L. Hansen, A. Adame, A. Cartier, D. Salmon, D. Galasko, S. Michael, J.N. Savas, J.R. Yates, C. Glabe, and E. Masliah. 2010. Progressive accumulation of amyloid-beta oligomers in Alzheimer's disease and in amyloid precursor protein transgenic mice is accompanied by selective alterations in synaptic scaffold proteins. *FEBS J.* 277:3051-3067.
- Pithadia, A.S., and M.H. Lim. 2012. Metal-associated amyloid-beta species in Alzheimer's disease. *Curr Opin Chem Biol.* 16:67-73.
- Ploper, D., H.X. Lee, and E.M. De Robertis. 2011. Dorsal-ventral patterning: Crescent is a dorsally secreted Frizzled-related protein that competitively inhibits Tolloid proteases. *Dev Biol.* 352:317-328.
- Postina, R., A. Schroeder, I. Dewachter, J. Bohl, U. Schmitt, E. Kojro, C. Prinzen, K. Endres, C. Hiemke, M. Blessing, P. Flamez, A. Dequenue, E. Godaux, F. van Leuven, and F. Fahrenholz. 2004. A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest.* 113:1456-1464.
- Prox, J., C. Bernreuther, H. Altmeppen, J. Grendel, M. Glatzel, R. D'Hooge, S. Stroobants, T. Ahmed, D. Balschun, M. Willem, S. Lammich, D. Isbrandt, M. Schweizer, K. Horre, B. De Strooper, and P. Saftig. 2013. Postnatal disruption of the disintegrin/metalloproteinase ADAM10 in brain causes epileptic seizures, learning deficits, altered spine morphology, and defective synaptic functions. *J Neurosci.* 33:12915-12928, 12928a.
- Pruessmeyer, J., and A. Ludwig. 2009. The good, the bad and the ugly substrates for ADAM10 and ADAM17 in brain pathology, inflammation and cancer. *Semin Cell Dev Biol.* 20:164-174.

- Puelles, L., E. Kuwana, E. Puelles, A. Bulfone, K. Shimamura, J. Keleher, S. Smiga, and J.L. Rubenstein. 2000. Pallial and subpallial derivatives in the embryonic chick and mouse telencephalon, traced by the expression of the genes *Dlx-2*, *Emx-1*, *Nkx-2.1*, *Pax-6*, and *Tbr-1*. *J Comp Neurol*. 424:409-438.
- Purro, S.A., S. Galli, and P.C. Salinas. 2014. Dysfunction of Wnt signaling and synaptic disassembly in neurodegenerative diseases. *J Mol Cell Biol*. 6:75-80.
- Puzzo, D., L. Privitera, E. Leznik, M. Fa, A. Staniszewski, A. Palmeri, and O. Arancio. 2008. Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. *J Neurosci*. 28:14537-14545.
- Puzzo, D., L. Privitera, and A. Palmeri. 2012. Hormetic effect of amyloid-beta peptide in synaptic plasticity and memory. *Neurobiol Aging*. 33:1484 e1415-1424.
- Querfurth, H.W., and F.M. LaFerla. 2010. Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 362:329-344.
- Quinn, J.C., M. Molinek, B.S. Martynoga, P.A. Zaki, A. Faedo, A. Bulfone, R.F. Hevner, J.D. West, and D.J. Price. 2007. Pax6 controls cerebral cortical cell number by regulating exit from the cell cycle and specifies cortical cell identity by a cell autonomous mechanism. *Dev Biol*. 302:50-65.
- Rakic, P. 1988. Specification of cerebral cortical areas. *Science*. 241:170-176.
- Rakic, P., A.E. Ayoub, J.J. Breunig, and M.H. Dominguez. 2009. Decision by division: making cortical maps. *Trends Neurosci*. 32:291-301.
- Rapti, M., S.J. Atkinson, M.H. Lee, A. Trim, M. Moss, and G. Murphy. 2008. The isolated N-terminal domains of TIMP-1 and TIMP-3 are insufficient for ADAM10 inhibition. *Biochem J*. 411:433-439.
- Rattner, A., J.C. Hsieh, P.M. Smallwood, D.J. Gilbert, N.G. Copeland, N.A. Jenkins, and J. Nathans. 1997. A family of secreted proteins contains homology to the cysteine-rich ligand-binding domain of frizzled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:2859-2863.
- Reardon, S. 2015. Antibody drugs for Alzheimer's show glimmers of promise. *Nature*. 523:509-510.
- Reiss, K., T. Maretzky, A. Ludwig, T. Tousseyn, B. de Strooper, D. Hartmann, and P. Saftig. 2005. ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling. *EMBO J*. 24:742-752.
- Reiss, K., and P. Saftig. 2009. The "a disintegrin and metalloprotease" (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions. *Semin Cell Dev Biol*. 20:126-137.
- Renstrom, J., R. Istvanffy, K. Gauthier, A. Shimono, J. Mages, A. Jardon-Alvarez, M. Kroger, M. Schiemann, D.H. Busch, I. Esposito, R. Lang, C. Peschel, and R.A. Oostendorp. 2009. Secreted frizzled-related protein 1 extrinsically regulates cycling activity and maintenance of hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*. 5:157-167.
- Ring, S., S.W. Weyer, S.B. Kilian, E. Waldron, C.U. Pietrzik, M.A. Filippov, J. Herms, C. Buchholz, C.B. Eckman, M. Korte, D.P. Wolfer, and U.C. Muller. 2007. The secreted beta-amyloid precursor protein ectodomain APPs alpha is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice. *J Neurosci*. 27:7817-7826.
- Rivera, S., M. Khrestchatsky, L. Kaczmarek, G.A. Rosenberg, and D.M. Jaworski. 2010. Metzincin proteases and their inhibitors: foes or friends in nervous system physiology? *J Neurosci*. 30:15337-15357.
- Rodriguez, J., P. Esteve, C. Weinl, J.M. Ruiz, Y. Fermin, F. Trousse, A. Dwivedy, C. Holt, and P. Bovolenta. 2005. SFRP1 regulates the growth of retinal ganglion cell axons through the Fz2 receptor. *Nat Neurosci*. 8:1301-1309.
- Ross, S.E., M.E. Greenberg, and C.D. Stiles. 2003. Basic helix-loop-helix factors in cortical development. *Neuron*. 39:13-25.
- Sahores, M., A. Gibb, and P.C. Salinas. 2010. Frizzled-5, a receptor for the synaptic organizer Wnt7a, regulates activity-mediated synaptogenesis. *Development*. 137:2215-2225.
- Saito, T., T. Suemoto, N. Brouwers, K. Slegers, S. Funamoto, N. Mihira, Y. Matsuba, K. Yamada, P. Nilsson, J. Takano, M. Nishimura, N. Iwata, C. Van Broeckhoven, Y. Ihara, and T.C. Saido. 2011. Potent amyloidogenicity and pathogenicity of Abeta43. *Nat Neurosci*. 14:1023-1032.
- Satoh, W., T. Gotoh, Y. Tsunematsu, S. Aizawa, and A. Shimono. 2006. Sfrp1 and Sfrp2 regulate anteroposterior axis elongation and somite segmentation during mouse embryogenesis. *Development*. 133:989-999.
- Scullion, G.A., D.A. Kendall, C.A. Marsden, D. Sunter, and M.C. Pardon. 2011. Chronic treatment with the alpha2-adrenoceptor antagonist fluparoxan prevents age-related deficits in spatial working memory in APPxPS1 transgenic mice without altering beta-amyloid plaque load or astrogliosis. *Neuropharmacology*. 60:223-234.
- Seals, D.F., and S.A. Courtneidge. 2003. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev*. 17:7-30.
- Selkoe, D., and R. Kopan. 2003. Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annu Rev Neurosci*. 26:565-597.
- Sennvik, K., J. Fastbom, M. Blomberg, L.O. Wahlund, B. Winblad, and E. Benedikz. 2000. Levels of alpha- and beta-secretase cleaved amyloid precursor protein in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *Neurosci Lett*. 278:169-172.
- Sessa, A., C.A. Mao, A.K. Hadjantonakis, W.H. Klein, and V. Broccoli. 2008. Tbr2 directs conversion of radial glia into basal precursors and guides neuronal amplification by indirect neurogenesis in the developing neocortex. *Neuron*. 60:56-69.
- Shankar, G.M., S. Li, T.H. Mehta, A. Garcia-Munoz, N.E. Shepardson, I. Smith, F.M. Brett, M.A. Farrell, M.J. Rowan, C.A. Lemere, C.M. Regan, D.M. Walsh, B.L. Sabatini, and D.J. Selkoe. 2008. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med*. 14:837-842.

- Shen, Q., Y. Wang, J.T. Dimos, C.A. Fasano, T.N. Phoenix, I.R. Lemischka, N.B. Ivanova, S. Stifani, E.E. Morrisey, and S. Temple. 2006. The timing of cortical neurogenesis is encoded within lineages of individual progenitor cells. *Nat Neurosci.* 9:743-751.
- Shimizu, T., T. Kagawa, T. Inoue, A. Nonaka, S. Takada, H. Aburatani, and T. Taga. 2008. Stabilized beta-catenin functions through TCF/LEF proteins and the Notch/RBP-Jkappa complex to promote proliferation and suppress differentiation of neural precursor cells. *Mol Cell Biol.* 28:7427-7441.
- Shimogori, T., J. VanSant, E. Paik, and E.A. Grove. 2004. Members of the Wnt, Fz, and Frp gene families expressed in postnatal mouse cerebral cortex. *J Comp Neurol.* 473:496-510.
- Shimojo, H., T. Ohtsuka, and R. Kageyama. 2008. Oscillations in notch signaling regulate maintenance of neural progenitors. *Neuron.* 58:52-64.
- Sisodia, S.S. 1992. Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:6075-6079.
- Skovronsky, D.M., D.B. Moore, M.E. Milla, R.W. Doms, and V.M. Lee. 2000. Protein kinase C-dependent alpha-secretase competes with beta-secretase for cleavage of amyloid-beta precursor protein in the trans-golgi network. *J Biol Chem.* 275:2568-2575.
- Solberg, N., O. Machon, and S. Krauss. 2008. Effect of canonical Wnt inhibition in the neurogenic cortex, hippocampus, and premigratory dentate gyrus progenitor pool. *Dev Dyn.* 237:1799-1811.
- Stevens, H.E., K.M. Smith, B.G. Rash, and F.M. Vaccarino. 2010. Neural stem cell regulation, fibroblast growth factors, and the developmental origins of neuropsychiatric disorders. *Front Neurosci.* 4.
- Subramanian, L., R. Remedios, A. Shetty, and S. Tole. 2009. Signals from the edges: the cortical hem and antihem in telencephalic development. *Semin Cell Dev Biol.* 20:712-718.
- Sugiyama, Y., E.J. Shelley, L. Wen, R.J. Stump, A. Shimono, F.J. Lovicu, and J.W. McAvoy. 2013. Sfrp1 and Sfrp2 are not involved in Wnt/beta-catenin signal silencing during lens induction but are required for maintenance of Wnt/beta-catenin signaling in lens epithelial cells. *Dev Biol.* 384:181-193.
- Suh, J., S.H. Choi, D.M. Romano, M.A. Gannon, A.N. Lesinski, D.Y. Kim, and R.E. Tanzi. 2013. ADAM10 missense mutations potentiate beta-amyloid accumulation by impairing prodomain chaperone function. *Neuron.* 80:385-401.
- Sun, T., and R.F. Hevner. 2014. Growth and folding of the mammalian cerebral cortex: from molecules to malformations. *Nat Rev Neurosci.* 15:217-232.
- Swiatek, P.J., C.E. Lindsell, F.F. del Amo, G. Weinmaster, and T. Gridley. 1994. Notch1 is essential for postimplantation development in mice. *Genes Dev.* 8:707-719.
- Takahashi, T., R.S. Nowakowski, and V.S. Caviness, Jr. 1996. The leaving or Q fraction of the murine cerebral proliferative epithelium: a general model of neocortical neuronogenesis. *J Neurosci.* 16:6183-6196.
- Tarabykin, V., A. Stoykova, N. Usman, and P. Gruss. 2001. Cortical upper layer neurons derive from the subventricular zone as indicated by Svet1 gene expression. *Development.* 128:1983-1993.
- Teich, A.F., and O. Arancio. 2012. Is the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease therapeutically relevant? *Biochem J.* 446:165-177.
- Tippmann, F., J. Hundt, A. Schneider, K. Endres, and F. Fahrenholz. 2009. Up-regulation of the alpha-secretase ADAM10 by retinoic acid receptors and acitretin. *FASEB J.* 23:1643-1654.
- Trevant, B., T. Gaur, S. Hussain, J. Symons, B.S. Komm, P.V. Bodine, G.S. Stein, and J.B. Lian. 2008. Expression of secreted frizzled related protein 1, a Wnt antagonist, in brain, kidney, and skeleton is dispensable for normal embryonic development. *J Cell Physiol.* 217:113-126.
- Tsai, R.Y., and S. Kim. 2005. Fibroblast growth factor 2 negatively regulates the induction of neuronal progenitors from neural stem cells. *J Neurosci Res.* 82:149-159.
- Tsuda, M., K. Kamimura, H. Nakato, M. Archer, W. Staatz, B. Fox, M. Humphrey, S. Olson, T. Futch, V. Kaluza, E. Siegfried, L. Stam, and S.B. Selleck. 1999. The cell-surface proteoglycan Dally regulates Wingless signalling in Drosophila. *Nature.* 400:276-280.
- Tyler, S.J., D. Dawbarn, G.K. Wilcock, and S.J. Allen. 2002. alpha- and beta-secretase: profound changes in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 299:373-376.
- Underwood, E. 2015. NEUROSCIENCE. Alzheimer's amyloid theory gets modest boost. *Science.* 349:464.
- Uren, A., F. Reichsman, V. Anest, W.G. Taylor, K. Muraio, D.P. Bottaro, S. Cumberledge, and J.S. Rubin. 2000. Secreted frizzled-related protein-1 binds directly to Wingless and is a biphasic modulator of Wnt signaling. *J Biol Chem.* 275:4374-4382.
- Vaccarino, F.M., M.L. Schwartz, R. Raballo, J. Nilsen, J. Rhee, M. Zhou, T. Doetschman, J.D. Coffin, J.J. Wyland, and Y.T. Hung. 1999. Changes in cerebral cortex size are governed by fibroblast growth factor during embryogenesis. *Nat Neurosci.* 2:848.
- Vassar, R., B.D. Bennett, S. Babu-Khan, S. Kahn, E.A. Mendiaz, P. Denis, D.B. Teplow, S. Ross, P. Amarante, R. Loeloff, Y. Luo, S. Fisher, J. Fuller, S. Edenson, J. Lile, M.A. Jarosinski, A.L. Biere, E. Curran, T. Burgess, J.C. Louis, F. Collins, J. Treanor, G. Rogers, and M. Citron. 1999. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science.* 286:735-741.
- Viti, J., A. Gulacsi, and L. Lillien. 2003. Wnt regulation of progenitor maturation in the cortex depends on Shh or fibroblast growth factor 2. *J Neurosci.* 23:5919-5927.
- Walsh, D.M., I. Klyubin, J.V. Fadeeva, W.K. Cullen, R. Anwyl, M.S. Wolfe, M.J. Rowan, and D.J. Selkoe. 2002. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature.* 416:535-539.

- Walsh, D.M., and D.J. Selkoe. 2007. A beta oligomers - a decade of discovery. *J Neurochem.* 101:1172-1184.
- Wang, S., M. Krinks, K. Lin, F.P. Luyten, and M. Moos, Jr. 1997. Frzb, a secreted protein expressed in the Spemann organizer, binds and inhibits Wnt-8. *Cell.* 88:757-766.
- Weintraub, S., A.H. Wicklund, and D.P. Salmon. 2012. The neuropsychological profile of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2:a006171.
- Welander, H., J. Franberg, C. Graff, E. Sundstrom, B. Winblad, and L.O. Tjernberg. 2009. Abeta43 is more frequent than Abeta40 in amyloid plaque cores from Alzheimer disease brains. *J Neurochem.* 110:697-706.
- Willert, K., J.D. Brown, E. Danenberg, A.W. Duncan, I.L. Weissman, T. Reya, J.R. Yates, 3rd, and R. Nusse. 2003. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature.* 423:448-452.
- Wolfe, M.S. 2007. When loss is gain: reduced presenilin proteolytic function leads to increased Abeta42/Abeta40. Talking Point on the role of presenilin mutations in Alzheimer disease. *EMBO Rep.* 8:136-140.
- Woodhead, G.J., C.A. Mutch, E.C. Olson, and A. Chenn. 2006. Cell-autonomous beta-catenin signaling regulates cortical precursor proliferation. *J Neurosci.* 26:12620-12630.
- Wrobel, C.N., C.A. Mutch, S. Swaminathan, M.M. Taketo, and A. Chenn. 2007. Persistent expression of stabilized beta-catenin delays maturation of radial glial cells into intermediate progenitors. *Dev Biol.* 309:285-297.
- Xavier, C.P., M. Melikova, Y. Chuman, A. Uren, B. Baljinnyam, and J.S. Rubin. 2014. Secreted Frizzled-related protein potentiation versus inhibition of Wnt3a/beta-catenin signaling. *Cell Signal.* 26:94-101.
- Yan, D., J.B. Wallingford, T.Q. Sun, A.M. Nelson, C. Sakanaka, C. Reinhard, R.M. Harland, W.J. Fantl, and L.T. Williams. 2001. Cell autonomous regulation of multiple Dishevelled-dependent pathways by mammalian Nkd. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:3802-3807.
- Yang, P., K.A. Baker, and T. Hagg. 2006. The ADAMs family: coordinators of nervous system development, plasticity and repair. *Prog Neurobiol.* 79:73-94.
- Yoon, K.J., B.K. Koo, S.K. Im, H.W. Jeong, J. Ghim, M.C. Kwon, J.S. Moon, T. Miyata, and Y.Y. Kong. 2008. Mind bomb 1-expressing intermediate progenitors generate notch signaling to maintain radial glial cells. *Neuron.* 58:519-531.
- Yoshida, M., S. Assimakopoulos, K.R. Jones, and E.A. Grove. 2006. Massive loss of Cajal-Retzius cells does not disrupt neocortical layer order. *Development.* 133:537-545.
- Yu, W.H., S. Yu, Q. Meng, K. Brew, and J.F. Woessner, Jr. 2000. TIMP-3 binds to sulfated glycosaminoglycans of the extracellular matrix. *J Biol Chem.* 275:31226-31232.
- Zhang, G.L., J. Zhang, S.F. Li, L. Lei, H.Y. Xie, F. Deng, J.C. Feng, and J.S. Qi. 2015. Wnt-5a prevents Abeta-induced deficits in long-term potentiation and spatial memory in rats. *Physiol Behav.* 149:95-100.
- Zhang, J., J.R. Shemezis, E.R. McQuinn, J. Wang, M. Sverdllov, and A. Chenn. 2013. AKT activation by N-cadherin regulates beta-catenin signaling and neuronal differentiation during cortical development. *Neural Dev.* 8:7.
- Zhang, J., G.J. Woodhead, S.K. Swaminathan, S.R. Noles, E.R. McQuinn, A.J. Pisarek, A.M. Stocker, C.A. Mutch, N. Funatsu, and A. Chenn. 2010. Cortical neural precursors inhibit their own differentiation via N-cadherin maintenance of beta-catenin signaling. *Dev Cell.* 18:472-479.
- Zhang, Y.W., R. Thompson, H. Zhang, and H. Xu. 2011. APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain.* 4:3.
- Zhou, C.J., C. Zhao, and S.J. Pleasure. 2004. Wnt signaling mutants have decreased dentate granule cell production and radial glial scaffolding abnormalities. *J Neurosci.* 24:121-126.
- Zi, X., Y. Guo, A.R. Simoneau, C. Hope, J. Xie, R.F. Holcombe, and B.H. Hoang. 2005. Expression of Frzb/secreted Frizzled-related protein 3, a secreted Wnt antagonist, in human androgen-independent prostate cancer PC-3 cells suppresses tumor growth and cellular invasiveness. *Cancer Res.* 65:9762-9770.

<http://www.gensat.org>

<http://developingmouse.brain-map.org/gene/show/20140>

<http://developingmouse.brain-map.org/gene/show/11275>

ANEXO
